RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 2 - Aprile 1954

RELAZIONI PATOLOGICO-IMMUNITARIE TRA PARASSITA E OSPITE IN *MACACUS RHESUS* INOCULATI CON SANGUE INFETTO DA *PLASMODIUM CYNOMOLGI*, SUCCESSIVAMENTE SPLENECTOMIZZATI, E RIPETUTAMENTE REINFETTATI CON CEPPO OMOLOGO.

AUGUSTO CORRADETTI e FELICE VEROLINI (*)

In precedenti ricerche (1, 2) abbiamo messo in evidenza che il *Plasmodium cynomolgi* inoculato in serie al *Macacus rhesus* mediante sangue infetto, conserva in ogni passaggio la proprietà di produrre recidive, senza che contemporaneamente si osservino forme endoepiteliali epatiche (**).

(*) *Istituto Superiore di Sanità.*

(**) Il termine « recidiva » (in inglese: « relapse ») ha dato origine a una critica di GARNHAM (*Tropical Diseases Bulletin, 48*, 437-38, 1951); il quale riferendosi al nostro lavoro in lingua inglese scrive: « It is unfortunate that the authors do not define « relapse ». If this term is confined to attacks of fever (or bouts of parasitaemia) following a primary attack, with parasite-free intervals between them, then there is no certainly that the attacks described in this paper belong to this category — they may well be recrudescences, or attacks of fever separated by periods during which the blood is never free of parasites (though these may only be detectable by massive blood inoculation into susceptible hosts). If this strict interpretation were applied, it may well be that relapses are due to persistent exo-erythrocytic forms while recrudescences are due to a persistent low parasitaemia with periodic fading immunity ».

E' ormai universalmente accettata la classificazione di JAMES ([3]) che distingue: a) *recrudescenze* per le positività del sangue che si verificano entro l'ottava settimana dalla fine dell'attacco primario; b) *recidive* per le positività osservabili tra la nona e la ventiquattresima settimana; v) *ricorrenze* per le positività riscontrabili oltre la venticinquesima settimana. Inoltre, quando non si intende fare una distinzione specifica, la parola « recidiva » si usa come termine generale.

Noi abbiamo usato il termine « recidiva » nel comune senso generale, ma abbiamo anche esattamente specificato il tempo di comparsa dei parassiti dopo la fine dell'attacco primario. A pag. 329 del nostro lavoro, a proposito del *P. malariae* abbiamo scritto: « All the patients showed more or less persistent parasitic relapses at a time varying from two to 29 weeks after the end of the primary attack. In two

Delle scimmie utilizzate per quella ricerca e di altre successivamente inoculate con sangue (74 scimmie in totale), dieci sono sopravvissute sufficientemente a lungo per permetterci di istituire esperimenti diretti a meglio chiarire le relazioni patologico-immunitarie tra il *P. cynomolgi* e il *M. rhesus* nelle infezioni indotte con sangue. I decorsi individuali di queste dieci scimmie, con un sommario degli esperimenti istituiti in ciascuna di esse, sono allegati in fondo al lavoro.

Le indagini sono state rivolte ai seguenti obiettivi: 1° Determinazione della durata minima e massima dell'infezione negli animali inoculati con sangue. 2° Risultati delle reinfezioni con ceppo omologo in scimmie non splenectomizzate e in scimmie splenectomizzate. 3° Ricerca di stadi endoepiteliali epatici nelle scimmie inoculate con sangue, effettuata in differenti periodi dell'infezione e in diverse condizioni immunitarie.

Materiale tecnico

Le 10 scimmie che sono state di base alle nostre ricerche appartengono, come si è detto a una serie di 74 scimmie tutte rese infette in passaggi consecutivi mediante inoculazione di sangue.

Di ciascun animale sono stati eseguiti quotidianamente esami microscopici del sangue per la ricerca dei parassiti per tutta la durata degli esperimenti (lacune nell'osservazione delle scimmie 3 e 5 sono riferite nella descrizione dei decorsi individuali).

Le 10 scimmie sono state distribuite per gli esperimenti come segue:

a) 8 scimmie (n. 2, 3, 5, 21, 24, 32, 34, 37) sono state splenectomizzate a varia distanza dalla fine dell'attacco primario.

b) la nona scimmia (n. 41), non splenectomizzata, è stata reinoculata quando, per la lunga negatività intercorsa, la prima infezione poteva considerarsi presumibilmente estinta.

---

subjects in particular, it was observed that *P. malariae*, after 31 and 34 inter-human passages respectively (all made through blood inoculation), still mantained the property of producing relapses 22 and 29 weeks after the end of the primary attack ». Inoltre a pag. 330, a proposito del *P. cynomolgi*: « Relapses may appear at any time during the period of observation, with more frequency at the 2nd-4th week, at the 15-16th and at the 27th-28th after the end of the primary attack ».

Come si vede, da quanto avevamo scritto risultava evidente che le nostre « recidive » comprendevano non le sole « recrudescenze », ma anche le vere « recidive » e le « ricorrenze » della classificazione di James.

Se poi non si accetta la classificazione di James, ma si considera « recidiva » soltanto la *ricomparsa dei parassiti dopo periodi di assoluta assenza dei parassiti stessi nel sangue*, si deve dimostrare che tali recidive realmente esistano e che si verifichino periodi di latenza in cui nessun globulo rosso sia parassitato. Tutta la nostra esperienza malariologica ci induce a ritenere che nei periodi di latenza il sangue non è mai totalmente libero dai parassiti, e che questi scompaiono di fatto dai globuli rossi solo con l'estinzione immunitaria dell'infezione.

c) 4 delle scimmie splenectomizzate e risultate negative (n. 2, 21, 32, 34) sono state reinoculate con ceppo omologo.

d) Una delle scimmie splenectomizzate e risultata ancora positiva (n. 24) è stata reinoculata con ceppo omologo dopo la guarigione della recidiva e l'estinzione dell'infezione.

e) 2 delle scimmie reinoculate (n. 24, 34) hanno avuto a distanza di tempo una seconda e una terza reinoculazione, e una di esse (n. 34) anche una quarta.

f) le biopsie epatiche sono state eseguite su quattro delle scimmie suddette (3, 21, 24, 37).

g) la decima scimmia (n. 50), non splenectomizzata è stata sottoposta a una serie di reinoculazioni e il suo sangue è stato subinoculato ad altre scimmie a diversa distanza di tempo dall'inoculazione.

Esperimenti

Gli esperimenti eseguiti su ciascuna scimmia sono descritti in dettaglio nei decorsi individuali allegati in fondo al lavoro. E' necessario tenere presenti i decorsi individuali per una esatta comprensione degli esperimenti che qui si descrivono.

1) *Risultati delle splenectomie.* — Essi son riassunti nella tabella 1 Per ciascuna scimmia abbiamo indicato il giorno (a partire dall'inoculazione)

Tabella 1

Scimmia	Giorno della splenectomia a partire dalla inoculazione	Risultato	Giorno in cui fu osservata l'ultima positività nelle scimmie che furono negative dopo la splenectomia
2	277°	Negativo	152°
3	251°	Recidiva	—
5	228°	Negativo	157°
21	443°	Negativo	338°
24	380°	Recidiva	—
32	219°	Negativo	91°
34	174°	Negativo	131°
37	93°	Recidiva	—

in cui la splenectomia fu effettuata, e il risultato della splenectomia stessa. Nell'ultima colonna della tabella abbiamo, per le sole scimmie che risultarono

non aver più parassiti, il giorno, sempre a partire dall'inoculazione, in cui era stata osservata l'ultima positività spontanea.

TABELLA 2

Tipo dell'esperimento e numero della scimmia	Risultato
a) *reinoculazione in scimmia non splenectonizzata*	
41	Reinfezione durata 11 giorni e guarita per crisi
b) *reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
2	Reinfezione durata 11 giorni e terminata per crisi (animale morto 16 giorni dopo)
21	Reinfezione con continua positività del sangue periferico per 376 giorni
24	Reinfezione durata 10 giorni e guarita per crisi
32	Reinfezione durata 10 giorni e seguita a breve distanza da due recrudescenze (della durata di 10 e 11 giorni rispettivamente)
34	Reinfezione durata 8 giorni e seguita a breve distanza da due recrudescenze (della durata di 19 e 10 giorni rispettivamente)
c) *seconda reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
24	Reinfezione durata 8 giorni e guarita per crisi
34	Reinfezione durata 9 giorni e guarita per crisi
d) *terza reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
24	Reinfezione durata 5 giorni (lieve parassitemia)
34	Reinfezione durata 4 giorni (lieve parassitemia)
e) *quarta reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
34	Negativa (osservata fino a 12 giorni dopo la reinoculazione, dopo di che la scimmia è morta)

2) *Risultati delle reinoculazioni.* — Essi sono riassunti nella tabella 2. Per ogni esperimento effettuato abbiamo indicato la scimmia o le scimmie su cui è stato eseguito e il risultato ottenuto.

3) *Risultati delle biopsie epatiche.* — Essi sono riassunti nella tabella 3. Questa tabella è stata costituita con tutti i dati in nostro possesso, ossia includendovi oltre le quattro nuove anche le sei biopsie eseguite dal dr. GRAMICCIA, di cui abbiamo parlato nei nostri precedenti lavori (1, 2). Nella tabella le biopsie sono state disposte in ordine di tempo a partire dall'inoculazione, e per ciascuna di esse è stato descritto lo stadio dell'infezione in cui si trovava la scimmia al momento della biopsia.

TABELLA 3

Numero della scimmia	Giorno dalla inoculazione in cui si è eseguita la biopsia	Risultato per la presenza di forme endoepiteliali epatiche	Stadio dell'infezione in cui era la scimmia al momento della biopsia epatica
4	11°	Negativo	Durante l'attacco primario
2	53°	Negativo	Durante una recrudescenza
1	67°	Negativo	Alla fine dell'attacco primario
37	75°	Negativo	Durante una recrudescenza
1	88°	Negativo	Durante una recrudescenza
5	116°	Negativo	Durante una recidiva
2	151°	Negativo	Durante una recidiva
3	260°	Negativo	9 giorni dopo la splenectomia, all'inizio della recidiva post-splenectomia
24	278°	Negativo	Durante una ricorrenza
21	697°	Negativo	154 giorni dopo la reinoculazione seguente la splenectomia (la scimmia era continuamente positiva nel sangue da 151 giorni)

4) *Risultati relativi alla scimmia* 50. — Sulla scimmia n. 50 sono state eseguite ricerche speciali che sono descritte nel decorso della scimmia stessa nell'allegato in fondo al lavoro.

I fatti emersi sono i seguenti:

a) la persistenza dei parassiti con negatività apparente del sangue, interrotta da ricomparse sporadiche, si è estesa dall'80° giorno dall'inoculazione al 653° giorno;

b) durante questo periodo si è avuta resistenza totale a quattro reinoculazioni di sangue infetto eseguite rispettivamente al 409°, al 431°, al 461°, e al 632° giorno dalla prima inoculazione;

c) durante lo stesso periodo tre subinoculazioni di sangue apparentemente negativo sono state eseguite a scimmie sane rispettivamente ai giorni: *a*) 475°, 478° e 481°; *b*) 502°; *c*) 585°, 601°, 623°. Di queste subinoculazioni le prime due (*a*, *b*) hanno avuto esito positivo;

d) l'ultima positività del sangue della scimmia 50 si è verificata al 703° giorno dall'inoculazione (la morte è avvenuta al 798° giorno).

Analisi dei risultati e discussione

Dalla tabella 1 risulta che degli 8 animali splenectomizzati, tre (3, 24, 37) hanno avuto una recidiva post-splenectomia e cinque sono rimasti negativi. La recidiva verificatasi nella scimmia 24 dimostra che il *P. cynomolgi* può ancora persistere nell'ospite al 380° giorno dopo la inoculazione di sangue infettante. D'altra parte il comportamento delle scimmie restate negative dopo la splenectomia dimostra che l'infezione può risultare totalmente estinta molto prima: al 228° giorno (scimmia 5), al 219° (scimmia 32) e perfino al 174° (scimmia 34).

Dai dati osservati nei nostri esperimenti risulta che i limiti entro i quali l'immunità acquisita dall'ospite riesce ad eliminare totalmente il parassita oscilla tra: — di 174 e + di 380 giorni dall'inoculazione.

Gli esperimenti compiuti sulla scimmia 50 dimostrano d'altra parte che la resistenza alla reinfezione e la positività delle subinoculazioni sono dimostrabili per lungo tempo (dall'80° al 653° giorno dall'inoculazione) in apparente totale negatività del sangue, e che la persistenza dei parassiti endoeritrocitici determinata a + di 380 giorni dall'inoculazione nei nostri sopra descritti esperimenti di splenectomia può elevarsi a + di 703 giorni.

Dalla tabella 2 risulta che una reinfezione eseguita su una scimmia non splenectomizzata (scimmia 41) è risultata positiva. Dal decorso individuale di questa scimmia si rileva che essa è stata reinoculata 488 giorni dopo la prima inoculazione e dopo una negatività apparente del sangue di 398 giorni. L'infezione risultata dalla reinoculazione ha avuto la durata di 11 giorni ed è guarita per crisi. L'animale è venuto a morte troppo presto per determinare l'insorgenza o meno di eventuali recidive.

Dal complesso dei risultati sugli esperimenti di reinoculazione in animali splenectomizzati, si può dedurre che l'organismo ospite, che è già guarito una volta dall'infezione prima della splenectomia, può non essere in grado di elaborare un'immunità sufficiente ad eliminare la seconda infezione. In tal caso (v. scimmia 21) si istituisce un'infezione caratterizzata dalla continua persistenza nel sangue di un alto numero di parassiti (tale da essere riscontrabile ogni giorno al microscopio), che dura quanto la vita dell'ospite (376 giorni nella scimmia 21).

Più comunemente (scimmia 2, 24, 32, 34) si verifica un attacco da rein-

fezione talvolta seguito da recrudescenze, che termina con la scomparsa totale dei parassiti, come è dimostrato dalla negatività di ripetute subinoculazioni del sangue ad altri animali indenni (cfr. decorso individuale della scimmia 24).

Dalla tabella 2 si rileva ancora che la guarigione dalla reinfezione avvenuta in assenza della milza non ha impedito l'attecchimento di una seconda reinoculazione, ma l'infezione è risultata di minore entità ed è guarita per crisi con nuova scomparsa totale dei parassiti, come è dimostrato dalla ripetuta negatività di subinoculazioni di sangue ad animali sani (cfr. decorsi individuali delle scimmie 24 e 34). La terza guarigione non ha impedito l'attecchimento di una terza reinoculazione, ma l'infezione è risultata ancora più debole e transitoria. Una quarta reinoculazione infine (effettuata sulla scimmia 34) non risultava avere attecchito al 12° giorno, data in cui si è verificata la morte dell'animale.

Dai decorsi individuali delle scimmie 24 e 34 si rileva che la seconda reinoculazione ha attecchito, essendo stata effettuata quando la guarigione dalla prima reinoculazione era avvenuta da non meno di 59 e non più di 107 giorni (scimmia 24) e rispettivamente da non più di 237 giorni (scimmia 34). La terza reinoculazione poi ha attecchito, essendo stata effettuata quando la guarigione dalla seconda reinoculazione era avvenuta da non meno di 47 e non più di 72 giorni (scimmia 24) e rispettivamente da non meno di 25 e non più di 71 giorni (scimmia 34).

Mettendo in rapporto questi fatti tra loro, si può concludere che, in assenza della milza, la seconda guarigione avvenuta in un tempo compreso tra 59 e 107 giorni prima della seconda reinoculazione non determina nell'ospite un grado di immunità sufficiente a prevenire l'attecchimento della reinoculazione stessa. Ugualmente la terza guarigione, avvenuta in un tempo compreso tra 25 e 71 giorni prima della terza reinoculazione, non produce nell'ospite un grado di immunità sufficiente a prevenirne l'attecchimento. Risulta tuttavia evidente che, anche in assenza della milza, l'elaborazione dell'immunità da parte dell'ospite di fronte a reinoculazioni ripetute appare ogni volta più rapida ed intensa, per cui ciascuna reinfezione successiva risulta più lieve e transitoria della precedente.

Dalla tabella 3 risulta che tutte le biopsie epatiche eseguite nei diversi stadi dell'infezione e in diverse condizioni immunitarie sono risultate negative. Particolarmente interessante appare il fatto che nè in una ricorrenza spontanea (scimmia 24), nè in una recidiva post-splenectomia (scimmia 3), nè infine in una scimmia splenectomizzata, reinoculata e continuamente positiva nel sangue da 151 giorni (scimmia 21), è stato possibile rilevare la presenza di forme endoepiteliali epatiche.

Mettendo ora in relazione i risultati ottenuti in questo lavoro con

quelli descritti nelle precedenti pubblicazioni (1, 2), possiamo giungere alla seguente conclusione generale.

Le infezioni da *P. cynomolgi* indotte nel *M. rhesus* mediante inoculazione di sangue parassitato, decorrono senza che sia possibile rilevare la formazione di forme endo-epiteliali epatiche. Questo equivale a dire che, nel caso specifico, le forme endoeritrocitiche non risultano svilupparsi nelle cellule del fegato, in nessun momento dell'infezione. Inoltre tale sviluppo nelle cellule epatiche non avviene neppure quando si produca artificialmente, con la splenectomia, un abbassamento del grado di immunità sufficiente a scatenare invece una recidiva endoeritrocitica, anche a grande distanza dall'inoculazione e dopo lunghi periodi di latenza (cfr. specialmente il decorso della scimmia 3 e anche quello della scimmia 24).

Malgrado l'assenza di forme endoepiteliali epatiche, si assiste nella quasi totalità delle scimmie inoculate con sangue al verificarsi di recrudescenze, di recidive, di ricorrenze, separate tra loro da talvolta lunghissimi periodi di latenza parassitaria. Tali ricomparse di parassiti non possono che essere dovute alla persistenza di forme endoeritrocitiche in numero limitato così da rimanere al disotto del numero necessario perchè un parassita abbia probabilità di essere osservato in uno striscio di sangue (*). Tre fatti fondamentali ripetutamente osservati da uno di noi in circa 20 anni di esperimenti sulle infezioni da plasmodi, dimostrano questa nostra asserzione: 1°) L'osservazione sporadica e casuale di forme endoeritrocitiche in pieno periodo di latenza (questo fenomeno si può rilevare quasi costantemente quando gli esami di sangue si compiano sistematicamente tutti i giorni per l'intero decorso). 2°) La positività delle subinoculazioni ad animali indenni del sangue prelevato in pieno periodo di latenza. 3°) La presenza di pigmento nero recentemente fagocitato nel reticolo endotelio delle scimmie morte in piena latenza o del tessuto delle milze estirpate in periodo di latenza.

Di conseguenza l'infezione prodotta con inoculazione di sangue può considerarsi *una infezione endoeritrocitica pura e continua*, i cui periodi di latenza corrispondono ad abbassamento numerico dei parassiti per opera del grado di immunità elaborato dall'ospite, e le cui recrudescenze, recidive e ricorrenze corrispondono a periodi di aumento numerico per moltiplicazione dei parassiti, verificatasi in relazione con abbassamenti spontanei o provocati del grado di immunità presente nell'ospite. Una prova evidente di questa interpre-

---

(*) Calcolando che il *M. rhesus* abbia circa 150 cc. di sangue (= 150.000 mm. cubi), ed essendovi circa 5.000.000 di globuli rossi ogni mm. cubo (4) occorre la presenza di 750.000 parassiti nel corpo della scimmia perchè si abbia la probabilità di incontrarne uno *ogni milione di globuli rossi nello striscio.*

Questo sempre presumendo che la distribuzione dei parassiti sia omogenea nel sangue e che non si verifichi una preferenza dei globuli parassitati a restare nei capillari degli organi interni.

tazione è data dal tumultuoso moltiplicarsi dei parassiti dopo la splenectomia effettuata in periodo di latenza: la splenectomia producendo un improvviso abbassamento del grado di immunità dell'ospite, ne deriva un immediato aumento del numero dei parassiti nei globuli rossi e l'insorgenza di una recidiva post-splenectomia.

Nel caso specifico del *P. cynomolgi* nel *M. rhesus* inoculato con sangue, l'infezione continua endoeritrocitica, lasciata decorrere spontaneamente, evolve con un'alternanza di remissioni e di aumenti numerici fino all'estinzione totale dei parassiti.

E' importante il fatto che abbiano avuto esito negativo i tentativi eseguiti per provocare artificialmente, con splenectomie e reinoculazioni, la comparsa di forme endoepiteliali epatiche. Ne deriva la deduzione che le forme endoeritrocitiche non si dimostrano in grado di invadere le cellule epatiche e che pertanto le forme endoepiteliali epatiche vanno considerate come derivanti solo dagli sporozoiti.

Correlando infine questi studi eseguiti sperimentalmente mediante inoculazione di sangue con quanto è noto sul decorso dell'infezione naturale prodotta da inoculazione di sporozoiti (sia nelle infezioni delle scimmie che in quelle dell'uomo), siamo indotti a ritenere che anche quando si inoculino sporozoiti il processo di origine delle recidive possa nella grande maggioranza dei casi, svolgersi nell'identica maniera.

Il ciclo endoepiteliale epatico nelle infezioni da plasmodi dei mammiferi (e ci riferiamo specialmente ai plasmodi dell'uomo, sui quali esiste un'enorme esperienza derivata da oltre mezzo secolo di ricerche in tutto il mondo) deve essere in genere limitato al periodo di incubazione e all'attacco di prima invasione. Il suo continuare nel proseguimento dell'infezione, benchè accertato in due diverse occasioni ([5], [6]), non può essere un fatto da accettare come costante senza che si compiano in proposito ulteriori estese ricerche. Se si trattasse di un reperto comune, pensiamo che non sarebbe facilmente spiegabile come mai nessuno degli innumerevoli patologi, che per oltre mezzo secolo hanno studiato soggetti deceduti per malaria, in tutti gli stadi dell'infezione, abbia mai descritto (magari non riferendole all'infezione malarica) le grossolane lesioni istologiche del ciclo endoepiteliale epatico.

I citati reperti di SHORTT e GARNHAM ([5]) e di SHORTT, BRAY e COOPER ([6]) sono molto importanti in quanto dimostrano la possibilità della persistenza di forme endoepiteliali epatiche in scimmie inoculate con sporozoiti di *P. cynomolgi* tre mesi e 115 giorni prima rispettivamente. I reperti stessi però non costituiscono da soli la dimostrazione che la persistenza delle forme endoepiteliali si verifichi costantemente, che non si verifichi contemporaneamente una persistenza del ciclo schizogonico endoeritrocitico, e che alle sole forme endoepiteliali siano dovute le recidive.

Il fatto che nelle infezioni indotte con sangue le recidive, anche a lunga

distanza dall'inoculazione, si verificano ugualmente senza che forme endoepiteliali epatiche risultino dimostrabili, dimostra d'altra parte che le forme del sangue possono esser da sole la causa delle recidive. E' evidente che nelle infezioni ottenute con sporozoiti, nei casi come quelli segnalati da SHORTT e collaboratori in cui si verifica una persistenza prolungata delle forme endoepiteliali epatiche, i merozoiti derivati da queste schizogonie endoepiteliali possono alimentare anch'essi le recidive: ma questo non esclude che le recidive derivino comunemente dalla persistenza del ciclo endoeritrocitico, persistenza ormai ampiamente documentata da numerose ricerche.

A noi sembra che il fascino che esercita la teoria dell'origine delle recidive dalle sole forme endoepiteliali epatiche (come quella dalle forme endoistiocitarie nella malaria degli uccelli) si basi, piuttosto che su esperimenti comparativi, sulla presunzione che la chinina o gli altri medicamenti somministrati debbano sistematicamente e sempre distruggere tutti i parassiti endoeritrocitici fino all'ultimo individuo. Vedendo che le recidive potevano verificarsi anche nei soggetti precedentemente curati, si è rimasti attratti, specie negli ambienti clinici dalla suggestiva spiegazione che i parassiti non potessero derivare dalle forme endoeritrocitiche, che si presumevano totalmente eliminate. Dopo la scoperta delle forme in cellule dei tessuti si è ritenuto logico attribuire le recidive solamente a queste: il che è contrastato dai nostri risultati

CONCLUSIONI

1) Nei *M. rhesus* inoculati con sangue infetto da *P. cynomologi*, la persistenza dei parassiti endoeritrocitici può durare fino a + di 703 giorni dopo l'inoculazione. D'altra parte l'infezione può risultare già estinta in — di 174 giorni dall'inoculazione.

2) Una reinfezione con ceppo omologo eseguita su una scimmia al 488° giorno dalla prima inoculazione (dopo una negatività apparente di 398 giorni), ha attecchito producendo un attacco di breve durata cessato per crisi.

3) Nelle scimmie guarite e successivamente splenectomizzate, una nuova reinoculazione di parassiti endoeritrocitici produce costantemente la reinfezione. L'organismo ospite può non essere in grado di elaborare un'immunità sufficiente ad eliminarla, cosicchè si istituisce un'infezione caratterizzata dalla continua persistenza dei parassiti nel sangue (in numero tale da essere rilevabile ogni giorno all'esame dello striscio) per tutta la durata della vita dell'ospite (fino a 376 giorni di positività continua osservati). Più comunemente l'organismo ospite, malgrado l'assenza della milza, riesce a estinguere anche la seconda infezione. Dopo la seconda guarigione si può ottenere una seconda reinfezione a cui segue una terza guarigione. Ciascuna infezione successiva è però di entità e durata sempre minore della precedente, per cui si as-

siste all'accrescersi della resistenza alle infezioni ripetute in un organismo ospite privo di milza.

4) Nelle scimmie inoculate con sangue le forme endoepiteliali epatiche sono risultate assenti in qualsiasi momento dell'infezione spontanea (attacco primario, recrudescenza, recidiva, ricorrenza) e anche durante abbassamenti del grado di immunità dell'ospite artificialmente provocati (recidiva post-splenectomia, reinoculazione dopo splenectomia).

5) Nelle scimmie inoculate con sangue le recidive originano dalle forme endoeritrocitiche sopravvissute nel periodo di latenza, che si moltiplicano in corrispondenza di abbassamenti spontanei o provocati dell'immunità dell'ospite.

ALLEGATO

DECORSI INDIVIDUALI DELLE SCIMMIE IN ESPERIMENTO

SCIMMIA 2.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 36 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 9 giorni, indi una recrudescenza durata 6 giorni. Si è così giunti al 57° giorno dall'inoculazione. Dal 58° in poi segue un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche occasionali fino al 152° giorno dall'inoculazione (dal 78° al 106° giorno il sangue non fu esaminato). Al 152° giorno i parassiti furono osservati per l'ultima volta, dopo di che il sangue permase negativo fino al 277° giorno.

Splenectomia al 277° giorno. Il sangue resta sempre negativo per tutta l'osservazione durata fino al 397° giorno (120° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 397° giorno dall'inoculazione. Il sangue diviene positivo al 404° giorno (cioè 7 giorni dopo la reinoculazione) e rimane fino al 415° (infezione intensa cessata per crisi). Negativo fino alla morte avvenuta al 431° giorno.

SCIMMIA 3.

Dopo 4 giorni di incubazione (inoculazione endovenosa) si hanno 17 giorni di positività. Segue una pausa di 15 giorni, indi una recrudescenza di 5: nuova pausa di 5 giorni seguita da 3 giorni di positività. Dal 44° al 79° giorno il sangue non viene esaminato. Dall'80° al 251° giorno continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 251° giorno. Positiva dal 258° (sette giorni dopo la splenectomia) al 279° giorno. Negativa dal 280° al 286° giorno. Positiva al 287° (ultimo giorno in cui si osservano i parassiti. Negativa dal 288° al 506° giorno (data della morte).

SCIMMIA 5.

Dopo 8 giorni di incubazione si hanno 13 giorni di positività. L'esame viene discontinuato per 35 giorni, dopo di che si osservano gruppi di giorni di positività alternati a gruppi di giorni di negatività. L'ultima positività si osserva al 157° giorno dall'inoculazione. Negatività dal 158° al 228°.

Splenectomia al 228° giorno dall'inoculazione. Negativa fino alla morte avvenuta al 405° giorno dall'inoculazione.

SCIMMIA 21.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 59 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 7 giorni, indi una recrudescenza durata 16 giorni: seguono 23 giorni

di pausa, e quindi altri 7 giorni di positività. Si è così giunti al 118° giorno dall'inoculazione. Dal 119° giorno in poi segue un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche occasionali fino al 338° giorno dall'inoculazione, ultimo giorno in cui si osservano i parassiti. Dal 339° al 443° giorno si ha continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 443° giorno dopo l'inoculazione. Il sangue resta sempre negativo durante tutta l'osservazione fino al 543° giorno (100° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 543° giorno dall'inoculazione. Il sangue diviene positivo al 546° giorno (cioè 3 giorni dopo la reinoculazione) e permane sempre tale fino alla morte dell'animale avvenuta al 922° giorno dall'inoculazione (376 giorni di positività continua).

SCIMMIA 24.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 32 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 14 giorni, indi una recrudescenza durata 8 giorni. Si è così giunti al 60° giorno dall'inoculazione. Dal 61° segue un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche fino al 322° giorno dall'inoculazione, ultimo giorno in cui si osservano i parassiti. Dal 323° a 380° si ha negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 380° giorno. Recidiva post-splenectomia due giorni dopo: la recidiva dura dal 382° al 408° giorno. Segue una pausa di 13 giorni, quindi un secondo periodo di positività durato 14 giorni: nuova pausa di 3 giorni e terzo periodo di positività di 12 giorni. Si è così giunti al 449° giorno dalla prima inoculazione (69° giorno dopo la splenectomia). Segue un periodo di negatività del sangue che dura dal 450° al 641° giorno dall'inoculazione (261° dopo la splenectomia). Subinoculazione di sangue di questa scimmia ad altre sane compiute ai giorni 611°, 621°, 635° dall'inoculazione (rispettivamente 231°, 241°, 255° dalla splenectomia) hanno dato esito negativo.

Reinoculazione al 641° giorno. Positiva dal 647° al 657° giorno (infezione intensa cessata per crisi). Il sangue permane negativo dal 658° al 764° giorno dall'inoculazione. Le subinoculazioni del sangue a scimmie sane compiute ai giorni 705°, 721° e 752° (rispettivamente 64°, 80°, e 111° dalla reinoculazione) hanno dato esito negativo.

Seconda reinoculazione al 764° giorno. Positività dal 768° a 776° giorno (infezione intensa cessata per crisi). Il sangue permane negativo dal 777° all'848° giorno. Le subinoculazioni compiute nei giorni 801°, 810° e 823° dall'inoculazione (rispettivamente 37°, 46° e 59° dalla ultima reinoculazione) non hanno prodotto l'infezione delle scimmie sane.

Terza reinoculazione all'848° giorno dall'inoculazione. Positiva dall'856° all'861° giorno (lieve infezione). Negativa dall'862° all'884° giorno (data della morte dello animale).

SCIMMIA 32.

Dopo un'incubazione di 9 giorni si hanno 40 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 13 giorni, indi una recrudescenza durata 13 giorni: seguono 16 giorni di pausa e quindi un nuovo periodo di positività di 12 giorni. Si è così giunti al 91° giorno dall'inoculazione. Dal 92° giorno al 219° si ha continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 219° giorno dall'inoculazione. Il sangue resta sempre negativo per tutta l'osservazione durata fino al 313° giorno (94° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 313° giorno dall'inoculazione. Il sangue diviene positivo al 315° giorno (cioè due giorni dopo la reinoculazione) e permane positivo fino al 325° giorno. Segue una pausa di 10 giorni, indi un periodo di positività durato 10 giorni: nuova pausa di 23 giorni e secondo periodo di positività di 11 giorni. Si è così giunti al 379° giorno (66° dopo la reinoculazione). Dal 380° giorno al 488° (data della morte dell'animale) si ha negatività del sangue periferico.

SCIMMIA 34.

Dopo 7 giorni di incubazione si hanno 36 giorni di attacco primario. Segue, dal 44° al 131° giorno dall'inoculazione, un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche occasionali: ultima osservazione dei parassiti al 131° giorno. dal 132° al 174° giorno si ha continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 174° giorno. Il sangue resta sempre negativo per tutta l'osservazione durata fino al 273° giorno dall'inoculazione (99° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 273° giorno. Positiva dal 276° al 284° giorno. Segue una pausa di 20 giorni, indi un periodo di positività durato 19 giorni: nuova pausa di 24 giorni e secondo periodo di positività di 10 giorni. Si è così giunti al 357° giorno dall'inoculazione (84° dalla reinoculazione). Dal 358° al 585° giorno si ha continua negatività del sangue periferico.

Seconda reinoculazione al 585° giorno. Positiva dal 587° al 596° giorno. Il sangue permane negativo dal 597° al 668° giorno. Subinoculazioni di sangue a scimmie sane eseguite al 643° e al 653° giorno (rispettivamente 46° e 56° giorno dall'ultima reinoculazione non hanno prodotto l'infezione.

Terza reinoculazione al 668° giorno. Positiva dal 673° al 676° giorno (lieve infezione). Negativa dal 677° al 708° giorno (data della morte dell'animale). Una *quarta reinoculazione* effettuata al 696° giorno non ha prodotto positività nei 12 giorni intercorsi fino alla data della morte.

SCIMMIA 37.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 33 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 10 giorni, indi una recrudescenza di 10 giorni: seguono 15 giorni di pausa e un periodo di positività durato 9 giorni. Si è così giunti all'83° giorno dall'inoculazione. Negatività del sangue periferico dall'84° al 93° giorno dall'inoculazione.

Splenectomia al 93° giorno dall'inoculazione. Recidiva post-splenectomia due giorni dopo: la recidiva dura dal 95° al 151° giorno. Dal 152° giorno al 170° (data della morte dell'animale) negatività interrotta dall'osservazione sporadica di parassiti al 157° giorno.

SCIMMIA 41.

Dopo un'incubazione di 10 giorni si hanno 13 giorni di positività. Segue una pausa di 52 giorni indi un periodo di positività durato 14 giorni. Si è così giunti all'89° giorno dall'inoculazione. Segue una negatività continua dal 90° al 488° giorno dall'inoculazione.

Reinoculazione al 488° giorno dell'inoculazione. Positiva dal 493° al 503° giorno. Negativa dal 504° al 542° giorno dall'inoculazione (data della morte dell'animale).

SCIMMIA 50.

Dopo 5 giorni di incubazione si hanno 15 giorni di positività. Segue una pausa di 13 giorni, indi una recrudescenza di 14 giorni: nuova pausa di 29 giorni e nuova positività di 6 giorni. Si è così giunti al 79° giorno. Negatività continua dall'80° al 409° giorno dall'inoculazione.

Reinoculazione al 409° giorno dall'inoculazione. Esito negativo.

Seconda reinoculazione al 431° giorno con sangue eccezionalmente carico di parassiti. Esito negativo con osservazione di un parassita nel sangue il giorno successivo (432°).

Terza reinoculazione al 461° giorno. Esito negativo.

Prima subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 67). Il sangue viene inoculato tre volte, rispettivamente ai giorni 475°, 478° e 481° dalla

prima inoculazione della scimmia 50. La scimmia subinoculata diviene positiva 5 giorni dopo l'ultima iniezione di sangue e svolge un'infezione normale.

Seconda subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 68). Il sangue viene inoculato una sola volta al 502° giorno dalla prima inoculazione della scimmia 50. La scimmia subinoculata diviene positiva 10 giorni dopo e svolge un'infezione normale.

Terza subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 69). Il sangue viene inoculato tre volte, rispettivamente ai giorni 585°, 601° e 623° dalla prima inoculazione della scimmia 50. La scimmia 69 non si infetta.

Quarta reinoculazione della scimmia 50, eseguita al 632° giorno dalla prima inoculazione.

In tutto questo periodo sperimentale, e cioè dall'80° giorno al 632°, la scimmia 50 era sempre stata negativa, con l'unica eccezione del giorno successivo alla seconda reinoculazione (432° dalla prima inoculazione).

La quarta reinoculazione ha esito negativo, mentre l'infezione si svolge regolarmente in altra scimmia di controllo (n. 70) inoculata con lo stesso sangue. Sporadici parassiti si osservano ai giorni 653°, 654° e 655°. La negatività prosegue fino al giorno 666° in cui con sangue apparentemente negativo della scimmia 50 si esegue la quarta subinoculazione a scimmia sana.

Quarta subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 74). Esito negativo. Il sangue della scimmia 50 si mantiene negativo fino alla morte avvenuta al 798° giorno dalla prima inoculazione

RIASSUNTO

Si espongono i risultati di ricerche condotte su scimmie (*Macacus rhesus*) infettate con *Plasmodium cynomolgi* mediante inoculazione di sangue, e successivamente splenectomizzate a distanza dalla guarigione apparente dell'attacco primario.

I limiti di durata dell'infezione, dedotti attraverso l'esame diretto del sangue, le subinoculazioni ad animali sani, e l'esame del sangue dopo splenectomia, sono risultati variare da meno di 174 giorni a più di 703 giorni dalla inoculazione.

Le scimmie splenectomizzate e risultate guarite sono suscettibili di contrarre una nuova infezione con ceppo omologo di *P. cynomolgi*. La reinoculazione può determinare un'infezione che si prolunga fino alla morte dell'animale, oppure un'infezione che viene rapidamente dominata dall'ospite. In quest'ultimo caso successive reinoculazioni determinano nuove infezioni, ciascuna delle quali risulta di entità e di durata sempre inferiori alle precedenti.

In nessuna scimmia studiata è stato possibile mettere in evidenza forme endoepiteliali epatiche nelle biopsie di fegato praticate in periodi differenti dell'infezione e in differenti condizioni immunitarie. Di conseguenza nelle scimmie inoculate con sangue l'origine delle recidive è sempre in rapporto alla presenza di forme endoeritrocitiche, il cui numero nei periodi di latenza è al disotto della soglia di visibilità microscopica, ma che iniziano una rapida moltiplicazione tutte le volte che, spontaneamente o artificialmente, si riducono le difese immunitarie dell'ospite.

SUMMARY

The paper describes the results of experiments conducted on monkeys (*Macacus rhesus*) which had been infected with *Plasmodium cynomolgi* by means of blood inoculation, and were subsequently splenectomized after the end of the primary attack.

The limits of duration of the infection, deduced by blood examination, sub-ino-

culation to healthy animals and blood examination after splenectomy, varied between less than 174 and more than 703 days after inoculation.

The splectomized monkeys which did not relapse (in other words showing a complete recovery) were liable to contract a re-infection with the homologous strain of *P. cynomolgi*. Re-inoculation resulted in either an infection which lasted, with continuous positive blood, the entire life of the host, or an infection which the host quickly, overcame. In the latter case subsequent reinoculations led to re-infections, each of them being less serious and shorter than the preceeding infections.

In no monkeys was it possible to detect endo-epithelial forms in liver biopsies taken in different periods of the infection and in different immunity conditions. Consequently the origin of the relapses, in blood-inoculated monkeys, is always related to the presence of endo-erythrocytic forms. The number of these latter is below the treshold of microscopic visibility in latent periods, but they rapidly multiply every time the immunitary defences of the host are spontaneously or artificially reduced.

BIBLIOGRAFIA

(1) Corradetti A., Verolini F. (1950). Studies on relapses in blood-induced infections from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium cynomolgi* - *The Journ. of the National Malaria Society*, *9*, 322-331.

(2) Corradetti A., Verolini F. (1951). Studi sulle recidive da *Plasmodium malariae* e da *Plasmodium cynomolgi*, in infezioni indotte con sangue. - *Rendic. Istit. Sup. Sanità*, *14*, 271-281.

(3) James S. P. (1931). Some general results of a study of induced malaria in England. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, *24*, 477-538.

(4) Malamos B. (1934). Das Blutbild bei Affenmalaria. - *Arch. f. Schiffs - u. Trop. Hyg.*, *38*, 374-386.

(5) Shortt H., Garnham P. C. C. (1948). Demonstration of persisting exoerythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. - *Brit. Med. Journ.*, 1225-1228.

(6) Short H. E., Bray R. S. e Cooper W. (1954). Further notes on the tissue stages of *Plasmodium cynomolgi*. - *Trans. Roy. Trop. Med. & Hyg.*, *48*, 122-131.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 2 - Aprile 1954

LE SEXE DES CERCAIRES DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

E. LAGRANGE (*)

Depuis les recherches de TANABE (1919), (1) on admet que toutes les cercaires issues d'un même mollusque, et nous envisagerons ici plus particulièrement le cas du Planorbe et de *S. mansoni*, sont d'un même sexe puisqu'elles donnent chez la souris qui est l'animal d'épreuve le meilleur, des adultes d'un même sexe

A cette règle, il existe de multiples exceptions. Il est intéressant de les examiner de plus près.

Malheureusement, la littérature concernant ces faits est très dispersée et il ne nous a pas été possible de consulter les articles originaux.

BRUMPT (2) cite les divers auteurs qui ont confirmé les constatations de TANABE. Il affirme, mais sans explications, que ces infestations unisexuées sont dûes à des cercaires issues d'un mollusque infesté par un seul miracidium.

GORDON, DAVEY et PEASTON (3) ont opporté à ce sujet des expériences personnelles et citent des travaux de LISTON et SOPARKAR (4), de VOGEL (5), et de FAIRLEY (6) que nous n'avons pas pu consulter dans l'original.

Parmi leurs recherches personnelles, il faut retenir les essais pratiqués sur 10 cobayes ayant été infestés par 1 mollusque (ou 2 pour un cas). Sur ces 10, trois n'ont pas présenté d'infection, quatre n'ont donné que des infections par des Schistosomes mâles, trois enfin infectés par les cercaires d'un planorbe ont présenté des infections bisexuées.

Encore s'agit-il de cobayes, dont l'infestation bilharzienne présente des caractères particuliers: jamais on ne trouve d'oeufs de parasites dans les matières fécales, lorsqu'on en trouve dans la foie.

VOGEL (5) a également obtenu chez le cobaye infecté par les cercaires d'un seul mollusque des adultes des deux sexes.

Dans nos expériences personnelles, (7) la guérison complète du cobaye a été de règle après un délai suffisant.

(*) *Fondation Médicale Reine Élisabeth, Institut de Recherches, Bruxelles.*

Jaffe', Mayer et Pifano (8) ont également étudié les animaux de laboratoire infestés d'un seul sexe de *S. mansoni*.

Nous avons sous les yeux leur travail de 1945, mais n'avons malheureusement pu prendre connaissance du mémoire de 1942 où ils ont publié leur bibliographie de la question. Ils citent cependant divers auteurs que je n'ai pas cités plus haut, Cort (1921), Severinghaus, Kosama et Suyemori (1924) Fairley, Mackie et Jasudasan (1930).

Leurs résultats diffèrent quelque peu de ceux que nous avons constatés. Ils observent notamment des guérisons spontanées de souris, dont la seule trace durable d'infestation est la pigmentation du foie. Ils observent également des lesions hépatiques, sans présence d'oeufs.

Ils ont également trouvé que sur 35 souris infestées par les cercaires d'un seul mollusque et examinées dans un état de conservation suffisant, deux souris présentèrent une infestation bisexuée (lot. n. 7) tandis que les 6 autres lots infestés le même jour présentèrent des infestations unisexuées.

Le tableau II de leur mémoire montre qu'il y eut le même jour, dans les mêmes conditions, des souris infestées de vers mâles, l'autres de vers femelles. tandis que deux enfin présentaient des infections bisexuées.

Le fait est si étrange que les auteurs eux-mêmes croient ne pas pouvoir exclure une erreur de technique et envisagent comme possible que les récipients aient été mêlés.

Dans les infestations unisexuées, l'infestation par des mâles est de loin la plus fréquente chez tous les observateurs.

* * *

Nos expériences personnelles ont été rapportées dans un exposé d'ensemble (9) en 1951 et se sont poursuivies avec une souche unique de *S. mansoni* que nous avons reçue en février 1948 du Professeur Kikuth qui la tient lui-même du Professeur Vogel d'Hambourg.

Sur plus de 1.500 souris qui ont réalisé 13 passages, il nous est arrivé de passer par des périodes critiques et de devoir infester des lots de souris (par 10 à la fois) avec 2, voire 4 planorbes seulement. A plusieurs reprises, nous avons ainsi rencontré des infestations unisexuées.

Toujours, toutes les souris d'un même lot (10 au moins au moment de l'infestation) présentaient des *Schistosoma* du même sexe et sauf pour un lot où il y eut des femelles immatures, ces infestations étaient provoquées par des mâles.

Sur un nombre aussi élevé de souris, il est permis de conclure que cette souche était incapable de donner chez le même mollusque des cercaires des deux sexes.

Ajoutons que dans ces infestations unisexuées, la survie des souris était pratiquement illimitée et, contrairement aux constatations de Fairley (6) Jaffe',

MAYER et PIFANO (8) et GIRGES (10) elles ne donnaient pas lieu à des lésions appréciables. Nous en avions conclu que c'étaient les oeufs qui provoquent les lésions hépatiques et éventuellement les hémorragies intestinales.

Ces résultats portant sur un grand nombre d'animaux, y compris cobayes, rats et cotton-rats, nous laissaient perplexes quant aux résultats obtenus par d'autres observateurs, lorsque de nouveaux essais nous ont mis en présence de faits différents.

En 1951, nous avons perdu notre souche, au cours d'une absence de quelques mois pendant notre mission au Congo, et au retour, en 1952, nous avons reçu du Professeur WANSON une nouvelle souche, congolaise, avec laquelle nous avons réalisé trois passages sucessifs avec les rèsultats suivants:

1*er passage* — 4 souris infestées en même temps avec les cercaires de 3 mollusques. Ces souris sont sacrifiées près de 3 mois après l'infestation. 2 présentent une infestation bisexuée; 2 sont négatives.

2*ème passage* — 4 souris infestées en même temps avec les cercaires de 16 mollusques. Infestation bisexuée chez toutes.

3*ème passage* — 2 souris infestées avec les cercaires d'un seul planorbe, le seul infesté sur 10 qui avaient été exposés à l'infestation et dont 8 avaient survécu suffisamment longtemps pour devenir infectieux. Ces 2 souris ont été baignées en même temps dans le même bain dans des conditions strictement identiques et il n'a pas été possible, faute de planorbes infestés, de compléter, ni de répéter les essais d'infestation. Or, 2 mois après, l'une meurt d'hémorragie intestinale et présente une infection bisexuée normale et l'autre sacrifiée le lendemain est indemne.

La souche s'est perdue. Nos observations n'ont pu être prolongées.

Le Professeur WANSON (11) m'informe qu'à l'heure actuelle il a également perdu la souche, mais qu'au cours des 18 passages successifs qu'il a réussis sur souris, il lui est arrivé également de faire des infestations de souris avec un seul planorbe et d'obtenir, avec cette même souche, des infestations bisexuées.

Dans notre cas unique d'une infestation unisexuée avec les cercaires d'un seul mollusque, toute erreur matérielle est éliminée puisque à ce moment notre élevage de mollusques en observation ne comportait qu'un exemplaire infectieux.

Nous nous sommes donc trouvé, au cours de nos recherches, en présence de deux catégories de souches, l'une capable de provoquer aux dépens d'un même mollusque des infections bisexuées, et par le fait mortelles, l'autre ne donnant dans les mêmes conditions que des infestations unisexuées. Dans celles-ci, les femelles n'arrivant pas à maturité sexuelle, il n'y a pas de ponte d'oeufs, pas de lésions hépatiques ni d'émorragies intestinales qui, entre nos mains paraissent conditionnées par la présence des oeufs dans ces tissus.

RESUME

L'auteur a observé pendant plusieurs années une souche de *S. mansoni* qui s'est révélée incapable de donner des infections bisexuées chez la souris par les cercaires d'un seul planorbe.

Par contre, une autre souche lui a donné une infection bisexuée par les cercaires d'un seul planorbe.

RIASSUNTO

L'autore ha compiuto durante vari anni osservazioni su di un ceppo di *S. mansoni* che si dimostrò incapace di produrre individui dei due sessi nel topino in seguito ad infezione con cercarie di un solo mollusco *(Planorbis)*.

Un altro ceppo, invece, ha prodotto individui dei due sessi in seguito ad infezione con cercarie di un solo *Planorbis*.

SUMMARY

The writer followed during many years a strain of *S. mansoni* which was unable to produce normal infections with the two sexes of worms, using as infective material the cercariae of a single planorbis.

Another strain gave him a bisexual infection with the cercariae of a single snail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tanabe (1919). Cité par Brumpt. Précis de parasitologie, 5ème éd. (1936) p. 679.
2. Brumpt, E. (1936). Précis de parasitologie, 5ème éd., Masson & C., Paris.
3. Gordon, K., T. Davey, H. Peaston (1934). *Ann. Trop. Med. Parasit., 28*, 323.
4. Liston W. G. et M. B. Soparkar (1918). *Ind. J. Med. Res.*, 5, 567.
5. Fairley, N. H. (1924). *Ind. Med. Gaz., 59*, 377.
6. Vogel, H. (1932). *Arch. f. Schiffs-u. Trop.-Hyg., 36*, 108.
7. Lagrange, E. et G. Scheecqmans (1949). *C. R. Soc. Biol., 143*, 1396.
8. Jaffe, R., M. Mayer, F. Pifano (1945). *Rev. San. Ass. Soc., 10*, 95.
8. bis Mayer, M. y F. Pifano (1942). *Rev. San. Ass. Soc., 7* (1).
9. Lagrange, E. et G. Scheecqmans (1931). *Ann. Soc. belge Méd. Trop., 31*, 193.
10. Girges (1929). *Lancet, 226*, 816.
11. Wanson (1953). Communication verbale.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 2 - Aprile 1954

OSSERVAZIONI SULLA EREDITA' DEI CARATTERI « RESISTENZA » E « SENSIBILITA' » AL DDT IN *MUSCA DOMESTICA* L.

G. D'ALESSANDRO (*) M. MARIANI (*)

Subito dopo la scoperta del fenomeno della resistenza al DDT in *Musca domestica*, dovuta a G. Sacca' (1947), in questo Istituto è stata intrapresa una serie di indagini sull'argomento. Abbiamo raccolto i dati ottenuti in questo campo, come pure in quello più vasto degli insetticidi clorurati, in una recente nota (D'Alessandro e Mariani, 1953) che riassume i vari contributi da noi finora resi noti.

Nella nostra prima memoria (D'Alessandro e Coll., 1948) venne per la prima volta descritta la ereditarietà dei caratteri sensibilità e resistenza al DDT, in *Musca domestica*, e furono resi noti i risultati di incrocio fra mosche sensibili e resistenti. Merita sottolineare la conclusione allora tratta: la resistenza delle mosche al DDT, manifestatasi nelle zone ripetutamente trattate con l'insetticida, è il risultato di un fenomeno selettivo di individui di *M. domestica* originariamente forniti di caratteri di resistenza ereditariamente trasmissibili; attraverso la selezione di tali individui ed il loro incrocio si assommano nelle generazioni successive i vari caratteri che stanno alla base della resistenza, la quale è verosimilmente un fenomeno complesso ascrivibile all'intervento di fattori diversi, alcuni dei quali individuati, altri ipotetici; si ottengono così in natura e nell'esperimento di laboratorio, generazioni super-resistenti il cui grado di resistenza supera di gran lunga quello posseduto dagli individui originari.

Successivamente ci è stato possibile ottenere, attraverso numerosi trattamenti selettivi, con isolamento di coppie particolarmente resistenti, un ceppo di *M. domestica* presentante resistenza di ordine elevatissimo (fino a vivere e a riprodursi in gabbia trattata su tutte le superfici con 3gr/mq

(*) *Istituto d'Igiene e Microbiologia dell'Università di Palermo* (Direttore: Professore G. D'Alessandro).

di DDT). Tale ceppo, allevato di poi in assenza di insetticidi per oltre 40 generazioni, non diede esempio di individui sensibili, mantenendo inalterata nei vari individui la originaria resistenza.

Pertanto lo stipite poteva essere considerato « resistente puro », almeno dal punto di vista del comportamento di fronte all'insetticida.

In possesso dello stipite con i caratteri su detti abbiamo ritenuto opportuno riprendere gli esperimenti di incrocio ai fini di uno studio ulteriore dell'ereditarietà del fenomeno. Dell'esito dell'indagine è stata data breve notizia in una nota preliminare (D'ALESSANDRO e MARIANI, 1953).

Ci pare opportuno di richiamare l'attenzione in via preliminare su di un punto della tecnica degli esperimenti da noi adottata che appare di particolare importanza anche in rapporto ai dati della letteratura recente sull'argomento. In questa ultima viene fatta distinzione fra resistenza all'intossicazione e resistenza alla caduta. Effettivamente in seguito al contatto con DDT le mosche sensibili cadono sul dorso ma spesso sono capaci di riprendere temporaneamente il volo, e ciò perchè la funzione alare viene colpita per ultima. Anche fra le mosche di ceppi resistenti occorrono frequentemente fatti di paralisi però suscettibili di regressione. E' chiaro pertanto che l'analisi del fenomeno resistenza può fornire risultati differenti a seconda che si prenda in esame la caduta, specie se si impiegano dispositivi a trappola, ovvero l'intossicazione irreversibile.

Nei nostri esperimenti abbiamo preso in considerazione la caduta definitiva dell'insetto senza possibilità di ripresa del volo (supinazione). Essa corrisponde, pertanto, alla intossicazione irreversibile; abbiamo però ritenuto preferibile l'annotazione *supinazione* in luogo di *mortalità* perchè effettivamente una costatazione di morte nelle mosche intossicate è estremamente difficile dato che, anche dopo molte ore, si osservano a forte ingrandimento tremiti nelle appendici, ed anche quando gli insetti sono assolutamente immobili il vaso pulsante può essere ancora funzionante per molto tempo (MARIANI, 1946).

E' chiaro comunque che per il loro significato i nostri esperimenti devono essere confrontati con quelli degli Autori che si riferiscono a mortalità

Riferiamo ora brevemente i contributi di alcuni studiosi che si sono occupati del problema in questi ultimi anni.

BUSVINE (1951) esaminando dati di HARRISON sui risultati di incroci fra mosche sensibili e resistenti, ritiene che essi autorizzano a concludere per la eredità di un singolo gene che determina la resistenza alla caduta e che non è del tutto recessivo.

Sostiene inoltre che la resistenza alla caduta non è sempre correlata con la resistenza all'effetto letale del DDT la quale può essere ereditata attraverso un diverso meccanismo.

LA FACE (1952) riferisce: « gli esperimenti di incrocio fra individui di ceppi

resistenti al DDT ed all'octacloro con altri ceppi sensibili ai due insetticidi, sui quali riferirò a suo tempo, non mi hanno dato tali risultati da dedurre che la resistenza dipenda da un fattore mendeliano semplice. In tutti gli incroci fatti a partire dal 1947 sino ad oggi, la sensibilità è espressa come carattere dominante nella F_1 ma nelle generazioni successive i rapporti mendeliani non sono apparsi evidenti e l'andamento della resistenza è stato tale da far pensare che i fattori genetici per questo carattere siano molteplici e che fattori ambientali possono venire a complicare i fenomeni ».

Beard, (1952) sostiene che gli esperimenti espressi con curve di mortalità sono infirmati dal fatto che le variazioni individuali di sensibilità non sarebbero statiche ma dinamiche: in altri termini, individui che soggiacciono ad un determinato trattamento oppure resistono al trattamento stesso non possono giudicarsi, rispettivamente, sensibili e resistenti perchè in un altro momento della loro vita essi potrebbero mostrare una resistenza o sensibilità diversa di fronte ad un uguale trattamento.

Keiding e Barbesgaard (1951-1953) dimostrano che nella progenie di incrocio fra mosche sensibili e mosche resistenti al DDT ha luogo una dissociazione nel rapporto di 3 sensibili ed intermedie rispetto ad una resistente; mentre nel reincrocio con resistente ottengono una sensibile ed intermedia rispetto ad una resistente e concludono: « Ciò indicherebbe che un singolo fattore è il determinante delle differenze maggiori nella resistenza al DDT, con sensibilità prevalente, benchè non completamente dominante sulla resistenza ».

Harrison (1951-1953), fondandosi su numerosi esperimenti di incrocio fra mosche sensibili e mosche resistenti, sostiene essere in gioco, per quanto si riferisce alla resistenza alla caduta (*knockdown*), una semplice eredità mendeliana, in cui la non resistenza è dominante per quanto in maniera incompleta. In ulteriori esperimenti condotti applicando il DDT direttamente sul mesonoto ed osservando la morte dell'insetto, questo Autore desume che la resistenza alla morte è in funzione di fattori ereditari multipli, distinguendosi in ciò dalla eredità della resistenza verso la caduta.

L'incrocio fra sensibili e resistenti dà luogo ad una F_1 molto omogenea con resistenza, approssimativamente, intermedia fra la resistenza dei ceppi parentali. Invece la F_2 è considerevolmente più eterogenea con presenza di alcuni individui resistenti al grado di quelli del ceppo parentale resistente e con un grande numero di resistenti intermedi.

MATERIALE E TECNICA.

In questi esperimenti ci siamo serviti di due ceppi rispettivamente « sensibile » e « resistente ». Di quest'ultimo è già stato fatto cenno; il ceppo sensibile è uno stipite allevato in laboratorio dal 1947, i cui individui erano

omogeneamente sensibili, al DDT, nel senso che se otteneva la mortalità del 100% dopo 30' di esposizione al contatto con l'insetticida.

Pupe dei due ceppi, S ed R, furono isolate individualmente in grossi provettoni, se ne ottenne la schiusura e si procedette alla formazione di coppie. Ciascuna coppia venne sistemata in una gabbietta di tulle nuova. Analogamente si procedette per le generazioni successive.

Ogni gabbietta era fornita di un beverino per l'acqua e di una zolletta di zucchero; dopo 7 giorni dalla schiusura, in ciascuna gabbietta venne introdotto un pasto per le larve costituito da una miscela di cruschello, acqua, latte e lievito di birra. La progenie di ogni singola coppia fu saggiata verso il DDT introducendo tutti gli individui in una gabbia dalle dimensioni di $40 \times 40 \times 42$ cm. con una parete di vetro, un finestrino a rete metallica della superficie di cm 15×12 e la rimanente superficie in legno, rivestito interamente da un intonaco di colla e gesso. Tutte le superfici interne erano state trattate con 3 gr./mq di DDT, al 75% di isomero p.p', in soluzione acetonica.

Come è stato ricordato in detta gabbia gli individui del ceppo S supinavano stabilmente entro 30'.

ESPOSIZIONE DEGLI ESPERIMENTI

1) vennero formate 25 coppie alle quali fu assegnato un numero progressivo

13 coppie	♂ R × ♀ S
12 coppie	♂ S × ♀ R

Da sedici coppie (5 ♂ S × ♀ R e 11 ♂ R × ♀ S) furono ottenute ovodeposizioni normali per numero di uova.

Ciascuna ovodeposizione fu allevata isolatamente con i consueti metodi e alcune pupe di ciascun gruppo furono isolate individualmente, in provettoni, per successivi incroci.

Circa 100 adulti derivanti da ciascuna ovodeposizione furono cimentati nella gabbia al DDT su descritta per saggiarne la resistenza.

Risultato: Il comportamento della F_1 delle singole coppie parentali, sia per gli incroci fra maschi sensibili e femmine resistenti che viceversa, fu uniforme; complessivamente la supinazione della popolazione F_1 si svolse entro 1 h 30' (grafico I) e il T.L. 50 fu di 62'.

2) Con gli adulti F_1, ottenuti dalle pupe isolate dal primo incontro, furono formate altre coppie ed ottenemmo 24 ovodeposizioni e quindi 24 gruppi di adulti F_2. Dodici di questi vennero cimentati, gruppo per gruppo, nella gabbia al DDT.

Risultato: Anche questa volta il comportamento verso il DDT, offerto dai singoli gruppi F_2, fu notevolmente uniforme il che ci permette di esprimere globalmente i dati ottenuti sulla popolazione F_2 e cioè:

27% supinato entro 30' } sensibili
10% supinato entro 50' }
17% supinato entro 1 h 30' (sensibilità uguale alla F_1)
27% supinato entro 10 h 30' (medio resistenti)
19% resistenti oltre le 12 ore (resistenti)

100%

3) Al fine di stabilire la purezza del carattere resistenza negli individui della F_2, indicati nella tabella precedente come « resistenti », le superstiti di ciascun gruppo dell'esperimento precedente, dopo 24 ore di per-

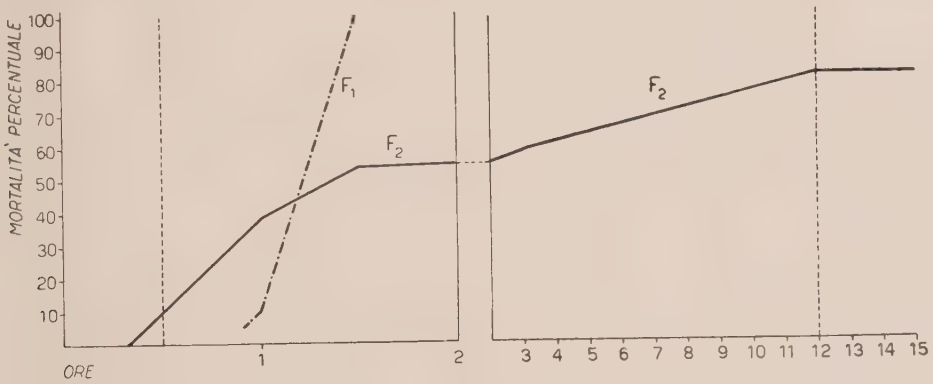

GRAFICO I — Curva integrale della mortalità media percentuale nel tempo della F_1 (linea a punti e tratti) e della F_2 (linea piena) di individui di *M. domestica*, ottenuti da incroci fra maschi sensibili e femmine resistenti e viceversa, in gabbia trattata con gr3/mq di DDT. Le linee verticali punteggiate separano le sensibili (all'estremità sinistra) e le resistenti (all'estremità destra) dal numeroso gruppo di medio-resistenti. Le prime due ore sono indicate in scala maggiore per mostrare l'andamento della curva ripida di mortalità della F_1.

manenza nella gabbia al DDT, furono prelevate ed allevate, ottenendosi ovodeposizioni, larve e adulti.

Otto gruppi F_3 così ottenuti furono cimentati nella gabbia al DDT.

Risultato: la sensibilità al DDT fu di grado assai diverso fra i vari individui con presenza anche di individui decisamente sensibili, supinanti cioè stabilmente entro 30'.

4) Analogamente fu studiato il comportamento di mosche sensibili della F_2 incrociandole tra loro per stabilirne la purezza del carattere « sensibilità » attraverso la discendenza. Però il tentativo di individuare e quindi formare coppie sensibili presentò qualche difficoltà. Infatti era precluso il saggio preventivo nei confronti dell'insetticida. Il problema fu risolto forman-

do a caso coppie con individui maschi e femmine schiusi isolatamente da pupe della F_2. Ottenute le relative ovodeposizioni venne saggiata la sensibilità delle coppie parentali e vennero scelte le ovodeposizioni derivate da genitori entrambi egualmente sensibili al DDT, che erano, cioè, caduti irreversibilmente entro 30'.

Dato l'elevato numero di coppie da saggiare contemporaneamente, per la misura della sensibilità, ci siamo serviti di provettoni del diametro di 3 cm., nei quali era disposto un rettangolo di carta bibula avente i lati di cm. 11,5 × 4,3, pari ad una superficie di 50 cmq., imbevuto di 1 cc. di soluzione acetonica di DDT all'1% ed asciugato per 15 giorni a temperatura ambiente (25-26° C.).

Risultato: anche in questo esperimento, la progenie F_3 delle varie coppie sensibili, formate nella maniera esposta, offrì un comportamento

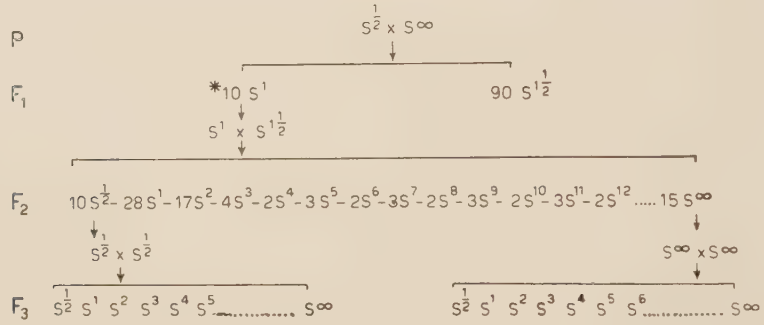

Grafico II — Rappresentazione grafica dei risultati di incrocio fra mosche « sensibili pure » e mosche « resistenti pure ». Sono indicati con S gli individui la cui resistenza è computata in ore di contatto (n) occorrenti per produrre la supinazione irreversibile. Il numero che precede la lettera S indica il numero di individui. Così, p. e., 4 S^3 deve leggersi: 4 individui che supinano dopo 3 ore di contatto con l'insetticida. Il segno S^∞ indica quegli individui che non risentono della azione del tossico nel tempo.

pressocchè uniforme. Complessivamente i ceppi ottenuti si dimostrarono formati da individui forniti di sensibilità assai variabile con presenza di individui sensibili, medio-resistenti e resistenti.

Gli esperimenti 3 e 4 ora riferiti hanno dunque chiaramente dimostrato che, nè gli individui resistenti, nè gli individui sensibili della F_2, possono considerarsi puri rispetto ai caratteri resistenza e sensibilità.

Nel grafico II sono riassunti i risultati dei vari incroci. In esso i vari individui sono indicati con S, il numero che precede la S esprime la percentuale degli individui stessi; l'esponente indica il tempo in ore necessario per produrne la supinazione in seguito a contatto con DDT. Per i dati della F_3 non sono stati indicati i valori percentuali.

Il grafico III traduce in una curva differenziale, con dati rilevati ogni due ore, l'andamento della supinazione della F_3; essa ha l'andamento di una curva espansionale tendente verso lo 0.

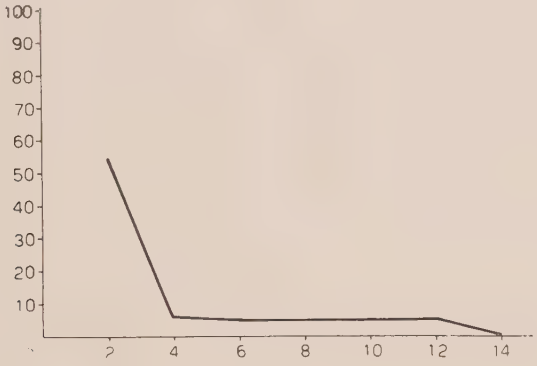

GRAFICO III — Curva sperimentale differenziale della mortalità di mosche, appartenenti alla F_2 derivata da incrocio fra sensibili e resistenti, in gabbia trattata con 3gr./mq di DDT. I rilievi della mortalità sono fatti ogni due ore.

Nel corso di questi esperimenti abbiamo avuto opportunità di confermare largamente un rilievo già ripetutamente fatto e cioè che le mosche resistenti sono notevolmente più prolifiche di quelle sensibili e che fra le sopravvissute ai trattamenti predominano le ♀♀. Questi comportamenti non devono essere necessariamente legati alla resistenza. Analogamente GAGLIANI (1952) ha dimostrato che la maggiore durata della vita larvale non è appannaggio degli stipiti resistenti ma che si tratta di una caratteristica legata a particolari ceppi.

Desideriamo ora segnalare il caratteristico andamento della mortalità delle mosche della F_2 messo in rilievo nella tabella grafica riassuntiva. Si nota infatti che gli individui che resistono fra le tre e le dodici ore hanno un andamento di mortalità alternato matematicamente e cioè: il 2% cade fra la terza e la quarta ora, il 3% fra la quarta e la quinta, il 2% fra la quinta e la sesta e così fino alla dodicesima ora. Si può dire che fra la terza e la dodicesima ora cade esattamente il 5% di mosche ogni due ore. L'interpretazione di tale fatto sorprendente è oscura e d'altra parte non ne abbiamo analizzata statisticamente la significatività.

DISCUSSIONE

Prima di ogni altra considerazione ci sembra necessario discutere la questione sollevata da BEARD (1952).

Ammettiamo, senza riserve, che vi siano variazioni di sensibilità agli insetticidi nel corso della vita di un insetto, le quali possono essere correlate a

condizioni diverse, come: di digiuno o di supernutrizione (CATALANO e MARIANI, 1948), di qualità degli elementi ingeriti come dieta grassa o magra (MER e FURMASKA, 1953), ecc. Si tratta però di variabilità nel comportamento di grado modesto, fondamentalmente differente nel significato dai fenomeni di resistenza che si osservano negli individui di popolazioni selezionate contro il tossico. Al riguardo va notato che le curve di mortalità di popolazioni di mosche catturate in natura e non precedentemente sottoposte all'azione dell'insetticida hanno l'andamento di una curva binominale o di Gauss (MARIANI, 1948) mentre in seguito a trattamenti selettivi, nelle successive generazioni, gli scarti quadratici si allontanano dalla media sempre più verso destra, dimostrandosi una maggiore omogeneità di resistenza fra gli individui saggiati. Ciò fa escludere che la variazione di sensibilità di questi individui sia di tipo dinamico.

Analizzando ora i dati delle nostre indagini, dal comportamento della F_1, prodotto dell'incrocio fra individui sensibili e individui resistenti puri, di fronte all'insetticida, saremmo indotti a propendere per la dominanza del carattere sensibilità, per quanto anche in essa F_1 sia già ravvisabile l'influenza del genitore resistente. Il comportamento è cioè tale da far escludere una dominanza della sensibilità come in un caso unifattoriale.

A questo riguardo è maggiormente esplicativo il comportamento della F_2.

Infatti se la resistenza fosse legata ad un solo carattere, nella F_2 ci si dovrebbe aspettare una « mendelizzazione », ottenere cioè il 25% di resistenti puri, il 25% di sensibili puri ed il 50% di meticci (*) a comportamento uguale a quello dei meticci della F_1.

Al vaglio dell'esperimento è risultato, invece, che nella F_2 le sensibili, e cioè le mosche che supinano entro i primi 30 minuti di esposizione al tossico, rappresentano soltanto il 10% della popolazione. D'altronde neppure questa quota apparve pura nella successiva generazione (F_3).

Analogamente le resistenti della F_2 accoppiate fra loro originarono una prole composta da individui sensibili e resistenti in vario grado.

Poichè nelle varie generazioni esperimentate, derivate dagli incroci fra sensibili o fra resistenti della F_2, non sono stati ottenuti individui omozigoti sembra chiaro che i caratteri « sensibilità » e « resistenza » sono talvolta dominanti, talaltra recessivi.

A questo punto desideriamo far rilevare che isolare un ceppo sensibile puro da una popolazione proveniente da incroci fra sensibili e resistenti è estremamente difficile e quasi impossibile perchè il carattere resistenza si presenta talvolta come dominante e talaltra come recessivo a seconda dell'accoppiamento di gruppi di alleli.

La selezione di un ceppo resistente puro è invece possibile. Infatti sot-

(*) Ci serviamo impropriamente dei termini meticcio e meticciamento per indicare i prodotti degli incroci reciproci fra sensibili e resistenti.

toponendo le popolazioni, di generazione in generazione, alla selezione di fronte al tossico, prima che gli individui che la compongono siano sessualmente maturi (a tre giorni dalla schiusura degli adulti) vengono progressivamente eliminate le sensibili a carattere dominante; di conseguenza, dopo 25-30 generazioni il carattere sensibilità residuato allo stato di recessivo viene eliminato man mano che si presenta negli individui delle nuove generazioni come dominante. Come abbiamo già riferito ci fu possibile ottenere in tal modo un ceppo resistente puro, ma la stessa difficoltà ed eccezionalità del risultato dà la dimostrazione che il carattere « sensibilità » è capace di riapparire dopo varie generazioni selezionate di fronte al tossico, comportandosi come recessivo.

In conclusione appare evidente dai nostri esperimenti che gli alleli « resistenza » e « sensibilità » non si comportano quali unità come è nella tipica eredità mendeliana; ci troviamo bensì di fronte ad un polimeria di caratteri.

I dati da noi riferiti collimano fondamentalmente con quelli già in precendenza da noi stessi ottenuti (1948) e con quelli di La Face, Harrison e Keiding; tale concordanza si riferisce agli esperimenti nei quali vennero presi in considerazione i dati della intossicazione irreversibile.

Si potrebbe avanzare l'ipotesi che fenomeni di incompleta espressività del gene entrino in gioco ma è dubbio che essi esplichino, nella fattispecie, una influenza fondamentale.

Non vi è dubbio infine, che l'eredità dei caratteri sensibilità e resistenza sia legata ai cromosomi, pur non potendosi escludere senza altro l'intervento di fattori citoplasmatici, per i quali non vi è però indizio allo stato attuale delle ricerche. Nè sembra che nelle mosche il comportamento ereditario della resistenza sia legato essenzialmente al sesso, il che è dimostrato dall'identità di comportamento fra la prole derivata da incroci reciproci.

Dall'insieme delle nostre osservazioni ci sembra di poter concludere come già nel 1948, per la pluralità dei fattori che determinano la resistenza al DDT. Tale interpretazione è confermata dall'osservazione *che in natura non troviamo mai individui resistenti al grado di quelli per lungo tempo selezionati in laboratorio;* in queste ultime condizioni sperimentali, per il continuo incrociarsi di individui portatori di fattori di resistenza, e attraverso la progressiva eliminazione degli eterozigoti, nella fase in cui la sensibilità si mostra allo stato di dominanza, si produce un accumulo uniforme dei fattori (omozigoti) di resistenza nei singoli individui, quale soltanto accidentalmente potrebbe verificarsi in natura.

RIASSUNTO

Gli A.A. hanno ripreso lo studio dell'eredità dei caratteri sensibilità e resistenza al DDT, iniziati nel 1948.

Attraverso incroci fra un ceppo sensibile puro ed un ceppo resistente puro, il quale non dava esempio di sensibilità nei suoi individui dopo 40 generazioni allevate in assenza di insetticida, sono pervenuti alla conclusione, già tratta dalle precedenti ricerche, che gli alleli resistenza e sensibilità non si comportano quali unità come nella tipica eredità mendeliana e che la resistenza all'intossicazione da DDT è determinata da una polimeria di caratteri.

SUMMARY

The authors have developed their previous study, started in 1948, on the inheritance of DDT resistance. True breeding strains have been used. The resistant one showed no sign of susceptibility after 40 untreated generations. Crosses between these strains have led the authors to the same conclusions reached in the preceeding experiments: the alleles for resistance and susceptibility do not behave as unities, as it occurs in the typical Mendelian inheritance; resistance to intoxication by DDT is determined by polymerous characters.

BIBLIOGRAFIA

BEARD, R. R. (1952): Effect of sub-lethal doses of toxicants on susceptibility of insects to insecticides. *Journ. Econ. Ent.*, *45*, 561.

BUSVINE, J. R. (1951): Laboratory investigations with insecticide-resistant houseflies. *Atti IX Congresso Internaz. di Entomol., Amsterdam, XIII*, 2-3.

D'ALESSANDRO, e Coll. (1948): Sulla resistenza delle mosche al DDT. *Atti XII Congresso Ass. Ital. per l'Igiene* e *Sicilia Medica, VI*, 5-16.

D'ALESSANDRO, G., MARIANI, M., GAGLIANI, M. (1952): Selezione di ceppi forniti di caratteristiche differenti da unica popolazione catturata in natura. *Riv. di Parass., XIII*, 169-175.

KEIDING, J. (1951): Development of resistance in the field and studies of inheritance. *Trans. of the IXth Internat. Congr. of Entomol., 2*, 340-345.

HARRISON, R. A. (1951): Further studies on DDT-resistant Houseflies in New Zealand. *New Zealand Sc. Tech., 33 B* (1).

LA FACE, L. (1952): Sul comportamento ereditario della resistenza ad alcuni insetticidi in *Musca domestica. Riv. di Parass., XIII*, 57-60.

MARIANI, M. (1946): Contributo alla conoscenza del DDT. Sensibilità di alcune specie di insetti e meccanismo d'azione. *Giorn. di Medicina, suppl. al fasc.*, 9-10, 1946.

MARIANI, M. (1948): Studio sugli insetticidi e sul loro impiego pratico. *Giorn. di Sc. Nat. ed Econ. di Palermo, 46, Sez. II.*

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 2 - Aprile 1954

SUL COMPORTAMENTO INVERNALE E PRIMAVERILE DELLA MOSCA DELL'OLIVO (*DACUS OLEAE* GMEL.) IN PROVINCIA DI LATINA ED ALCUNE NORME DI LOTTA CONTRO L'INSETTO (*)

LIDIA LA FACE (**)

E' noto che nella provincia di Latina, come in molte altre regioni d'Italia, la produzione oleicola è seriamente minacciata dal *Dacus oleae*, insetto d'importanza economica nazionale. Sebbene numerosi studiosi abbiano già compiuto pregevoli ricerche su questo insetto, il cui ciclo biologico varia non solo nelle differenti regioni geografiche, ma anche nelle differenti località a determinati caratteri ecologici di una stessa regione, alcuni punti della sua biologia sono lungi dall'essere ben chiariti. Un punto della biologia di questo insetto che merita particolare attenzione è quello riguardante il suo comportamento invernale e primaverile. La determinazione, infatti, dei fattori che rendono possibile la sopravvivenza della mosca dall'autunno sino alla comparsa dei frutti inquinabili dell'annata successiva, può suggerire mezzi di lotta e misure generali atti ad interrompere, o almeno ad ostacolare, il ciclo vitale dell'insetto in tale periodo. Questa determinazione deve essere fatta per ogni singola località essendo i detti fattori molto variabili in dipendenza dei metodi colturali, della natura del terreno, delle vicende metereologiche, dell'epoca di raccolta delle olive ed anche delle consuetudini locali.

Riservandomi di esporre dettagliatamente in un lavoro di prossima pubblicazione i risultati di circa due anni di ricerche sulla biologia del *Dacus oleae* nella provincia di Latina, mi limito, per il momento, a rendere note alcune osservazioni che riguardano il comportamento invernale e primaverile dell'insetto nella regione suddetta e che possono fornire indicazioni utili per la lotta contro di esso. La continuità del ciclo vitale del *Dacus oleae*, nel periodo che va dall'autunno sino alla primavera e all'inizio dell'estate,

---

(*) Relazione presentata al I Congresso Internazionale degli Antiparassitari. Napoli, 19-23 ottobre 1953.

(**) *Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di parassitologia - Roma.*

è assicurata nella regione presa in esame dalla capacità di sopravvivenza della specie negli stadii di larva matura, di pupa e di insetto adulto. I due ultimi stadî trovano negli ambienti chiusi le condizioni più adatte per la loro sopravvivenza durante l'inverno. Durante tutta la stagione fredda ed anche in primavera, numerosissimi adulti sfarfallano dai pupari che si accumulano nei magazzini e nei locali di deposito in genere, ma soprattutto nei frantoi man mano che vi si trasportano le olive per la spremitura, operazione che si protrae in alcune località della provincia di Latina per tutto l'inverno sino al maggio. Molte olive raccolte durante l'inverno nelle località infestate contengono larve mature dell'ultima generazione autunnale le quali abbandonano i frutti quando questi sono trasportati nei frantoi, per impuparsi soprattutto nelle fessure dei pavimenti e dei cassoni di deposito. Il numero dei pupari che si riscontrano nei frantoi dall'autunno alla primavera è variabile, spesso enorme: ciò in rapporto al grado di infestazione delle località da cui provengono i frutti che vi sono trasportati e al periodo di tempo che intercede tra il momento in cui sono trasportati al frantoio e la spremitura. Ho potuto osservare che ad una temperatura compresa fra 10° e 14°C. e ad una umidità relativa del 75-80%, condizioni che si verificano in molti frantoi, si ha, durante l'inverno, una schiusura continua dei pupari; gli adulti che ne fuoriescono appaiono torpidi e, solo se stimolati, si muovono a stento. Come risulta da alcune osservazioni che ho compiuto sulla longevità degli adulti nei luoghi chiusi in genere, una grande parte degli individui sfarfallati nei frantoi è destinata a perire, ma un buon numero di essi, se trova in questi ambienti di sviluppo condizioni microclimatiche favorevoli può sopravvivere, resistendo al digiuno, fino all'inizio della primavera. A cominciare dal mese di marzo e ancora più nella prima quindicina di aprile, si osserva che gli alati schiusi nei frantoi diventano attivi, accorrono numerosi verso i vetri delle finestre e tendono ad abbandonare i loro ricoveri volando all'aperto, spinti dalle esigenze trofiche e genetiche. Nel maggio non si osservano più alati nei frantoi. Con ogni probabilità gli alati sviluppatisi durante l'inverno nei frantoi ed in altri ambienti chiusi contribuiscono largamente alla generazione primaverile che si svolge in quelle località dove i frutti dell'annata precedente permangono sugli alberi tutto l'inverno, anche sino al mese di maggio. Quest'ultima evenienza si verifica specialmente nelle località (ad es. nel comune di Norma) dove si pratica largamente il commercio delle olive da tavola e dove perciò i frutti vengono lasciati sugli alberi sino alla maturazione completa, cioè sino a primavera avanzata. Non è da escludere nemmeno, in base ad esperimenti che ho compiuto in condizioni naturali, che gli alati dell'ultima generazione autunnale che hanno svernato nei frantoi e che abbandonano questi locali in primavera, possano sopravvivere all'aperto, se trovano sufficiente nutrimento, fino a quando le olive dell'anno hanno raggiunto il grado di maturazione che le rende atte a ricevere l'uovo della mosca, cioè sino

al luglio ed anche sino ai primi di agosto. Questi alati, unitamente a quelli, pure dell'ultima generazione autunnale, che si sviluppano dalle pupe svernanti nel terreno, sono i soli responsabili della prima infestazione estiva nelle località dove la raccolta si compie in autunno e, per conseguenza, non rimangono sulle piante frutti capaci di albergare una generazione primaverile, il che si verifica, invece, nelle località dov'è consuetudine prolungare la raccolta sino al maggio. Non v'è dubbio che l'abbondanza numerica degli individui di *Dacus oleae* che compiono la ninfosi, durante l'inverno e all'inizio della primavera, negli ambienti chiusi sia grandemente favorita dalla raccolta tardiva. E' opinione generalmente diffusa che la ninfosi del *Dacus oleae* si effettui nell'interno delle olive per le generazioni estive e nel terreno per le generazioni autunnali e che, più della stagione e della temperatura, sia essenzialmente il grado di maturazione dei frutti a determinare la larva pronta alla ninfosi a rimanere in essi o ad abbandonarli. Ho potuto però osservare che per le larve che si sviluppano in autunno la temperatura è un fattore essenziale nel determinare l'abbandono del frutto o il permanere in esso. Ho infatti trovato, per tutto l'inverno negli oliveti a raccolta tardiva, frutti contenenti pupari e larve mature, ma non larve di stadi più arretrati. Ciò indicherebbe che in autunno, finchè la temperatura si mantiene relativamente mite, le larve possono abbandonare il frutto per impuparsi nel terreno, ma al sopraggiungere dei freddi invernali rallentano il loro sviluppo continuando ad evolversi lentamente per rimanere nell'ultimo stadio e raggiungere in parte la ninfosi nel frutto stesso. Le larve che si trovano, durante l'inverno, nell'interno dei frutti appaiono torpide e capaci solo di deboli movimenti, se stimolate. Ma se i frutti sono raccolti ed ammucchiati nei frantoi in attesa della spremitura, l'elevamento di temperatura che, come ho potuto costatare, si verifica nei mucchi di olive, tanto più notevole quanto più a lungo esse rimangono ammassate, giungendo sino a 25°-30° C., è un fattore che, oltre alle condizioni sfavorevoli all'insetto create dal distacco del frutto dalla pianta, sollecita la larva ad abbandonare il frutto. Cosicchè, rimuovendo, in inverno, le olive ammucchiate nei cassoni, nei tini od in altri recipienti dei frantoi, è facile scorgere sul fondo di essi un brulicare di larve mobilissime e pupari di recente formazione. Ho osservato scarsi pupari in qualche frantoio dove si è soliti spremere le olive appena ammassate anche se queste provenivano da località fortemente infestate.

E' da ritenere che negli oliveti a raccolta tardiva gli alati che sfarfallano a primavera dalle pupe che hanno svernato entro i frutti, contribuiscano largamente alla generazione primaverile deponendo le uova nelle stesse olive in cui hanno attraversato la fase giovanile. Infatti, nei frutti di uno stesso oliveto dove, per tutto l'inverno e all'inizio della primavera, avevo osservato solo larve mature e pupe dell'ultima generazione autun

nale, ho notato accanto a quest'ultime, all'entrare del maggio e quando le olive erano ormai giunte a maturazione completa, numerose larvette di I° stadio sgusciate da uove deposte probabilmente da femmine dell'ultima generazione autunnale sfarfallate dalle stesse olive. Negli oliveti a raccolta tardiva della provincia di Latina si verificano quindi le condizioni atte allo svolgimento di una generazione primaverile che si sovrappone all'ultima autunnale. Per conseguenza, a primavera avanzata, l'infestazione negli oliveti a raccolta tardiva subisce un considerevole aumento ed è possibile osservare in questa stagione, 5-6 ed anche più larve giovani insieme a larve e a pupe dell'ultima generazione autunnale nello stesso frutto. Venendo a mancare, con il completamento della raccolta che non si protrae oltre il maggio, i frutti inquinabili dell'anno precedente, gli alati della generazione primaverile come quelli dell'ultima generazione autunnale possono sopravvivere, secondo gli esperimenti condotti in proposito, sino all'inizio dell'estate, cioè sino alla comparsa di olive dell'anno atte a ricevere l'uovo. Alla generazione primaverile ed alla prima generazione estiva, o alla prima soltanto nelle località in cui la riproduzione primaverile dell'insetto è inibita, contribuiscono anche, sebbene in proporzione minore, gli alati che si sviluppano dalle pupe svernanti nel terreno e la cui abbondanza numerica dipende non solo dalla natura di quest'ultimo che deve essere tale da consentire lo svolgersi in esso della ninfosi, ma ancora più dall'epoca di raccolta delle olive. Non ho rinvenuto, infatti, durante l'inverno, pupari nel terreno di oliveti in cui la raccolta non era stata protratta oltre l'autunno, cioè oltre il periodo in cui la larva non abbandona generalmente il frutto compiendosi la ninfosi nell'interno di questo. Le pupe che si riscontrano nel terreno degli oliveti a raccolta tardiva derivano con ogni verosimiglianza da larve che abbandonano i frutti caduti al suolo. Occorre, però, notare che nelle condizioni verificantesi generalmente nel territorio di Latina, più che il terreno degli oliveti sono gli ambienti chiusi, scuri, a temperatura moderata (10°-15° C.) e con un grado sufficiente di umidità i luoghi più adatti per la ninfosi durante l'inverno e dove le cause di distruzione dell'insetto in questo stadio sono infinitamente minori che all'aperto. Qui la rimozione del terreno in seguito ai lavori colturali, la soverchia aridità del suolo, che si verifica nelle stagioni particolarmente secche, l'intervento di predatori diversi, contribuiscono grandemente alla riduzione numerica dei pupari nel suolo.

In base a quanto ho esposto bisogna ritenere che nella provincia di Latina alla prima generazione estiva, che si inizia ai primi di luglio od anche più tardi a seconda delle vincende metereologiche, contribuiscono:

1) gli alati dell'ultima generazione autunnale sfarfallati nei frantoi e nei luoghi di deposito in genere e che volano all'aperto ai primi tepori primaverili sopravvivendo sino all'inizio dell'estate.

2) gli alati derivati dalle pupe dell'ultima generazione autunnale svernanti nel terreno e che sopravvivono pure sino all'estate.

3) gli alati dell'ultima generazione autunnale che sfarfallano all'aperto, in primavera, dalle olive lasciate sulla pianta per tutto l'inverno.

4) gli alati della generazione primaverile, là dove questa può verificarsi.

Contro questi individui che danno origine alla prima generazione estiva conviene concentrare i mezzi di lotta ed applicare alcune norme generali di difesa. La buona manutenzione e la disinfestazione, da compiersi nel settembre e non oltre i primi di ottobre, dei rifugi invernali della mosca, in particolare dei frantoi, la chiusura obbligatoria di quest'ultimi alla fine dell'autunno, se questa misura fosse effettuabile, contribuirebbero senza dubbio alla riduzione numerica dell'insetto. Il trattamento dei frantoi con insetticidi ad azione residua porterebbe innanzi tutto alla distruzione degli alati che si sviluppano in tali ambienti in numero talora enorme nell'ottobre, cioè all'epoca in cui vi si cominciano a depositare le olive in attesa di spremitura e che, volando all'aperto, contribuiscono largamente al dilagare dell'infestazione autunnale tardiva che si verifica in alcune località. Contribuirebbe inoltre alla distruzione degli alati che si sviluppano durante l'inverno e che sono capaci di sopravvivere sino alla comparsa delle olive dell'anno. Un esperimento di lotta invernale nei frantoi e nei magazzini è attualmente in corso a Latina. Bisogna notare però che la disinfestazione dei frantoi, dei magazzini e dei locali di deposito in genere non è sufficiente per la distruzione degli individui svernanti negli ambienti chiusi. Occorre tenere conto di un'usanza diffusa nella provincia di Latina come quasi dovunque. Eseguita, cioè, la raccolta, comincia ad aggirarsi negli oliveti una piccola folla di persone per lo più di modeste condizioni le quali nell'intento di procacciarsi un pò di olio pur non possedendo oliveti, vanno raccogliendo pazientemente i frutti rimasti sul suolo e li trasportano nelle loro case dove li ammucchiano in attesa di averne una quantità sufficiente da portare al frantoio. Nelle località più infestate queste olive raccolte al suolo sono quasi tutte bacate: trasportate negli ambienti più disparati prima che nei frantoi, le larve che ne fuoriescono e si impupano danno origine a numerosi piccoli focolai di infestazione la cui importanza non è trascurabile. Non è possibile, certo, procedere alla disinfestazione di questi focolai sparsi dovunque e di difficile identificazione. In questo caso solo un'attiva propaganda diretta a dimostrare anche alle persone meno colte i pericoli rappresentati dall'usanza suddetta e la necssità di distruggere in inverno le pupe di *Dacus oleae* con ogni mezzo ed in qualunque ambiente si formino, potrebbe dare buoni risultati.

La chiusura obbligatoria dei frantoi al finire dell'autunno potrebbe avere il valore di una misura atta a limitare in parte la raccolta tardiva

i cui svantaggi sono evidenti. Occorre tener presente infatti, che la lotta contro le ninfe e gli alati svernati negli ambienti chiusi non è sufficiente a determinare una diminuzione numerica degli individui da cui si origina la prima generazione estiva se, come avviene negli oliveti a raccolta tardiva della provincia di Latina, sono resi possibili lo svernamento dell'insetto all'aperto negli stadi di larva e di pupa e lo sviluppo di una generazione primaverile. La raccolta precoce appare quindi un mezzo atto a limitare sia il numero degli individui svernanti negli ambienti chiusi e capaci di sopravvivere all'aperto sino all'inizio dell'estate sia il numero degli individui che subiscono la ninfosi nel suolo e ad impedire, infine, lo svolgersi di una generazione primaverile, i cui alati hanno certamente maggiori probabilità di sopravvivenza sino a luglio ed anche sino all'agosto in confronto degli individui dell'ultima generazione autunnale. La raccolta tardiva che si compie in alcuni oliveti della provincia di Latina è attribuita a varie cause tra cui la mancanza di mano d'opera sufficiente e le possibili condizioni metereologiche avverse, ma è dovuta soprattutto al commercio, diffuso specialmente nel comune di Norma, delle olive da tavola. Gli oliveti in cui le olive vengono lasciate a tale scopo sugli alberi sino alla primavera avanzata, sono da considerarsi veri centri endemici dell'infestazione dacica. Sarebbe perciò opportuno limitare il commercio delle olive da tavola solo alle località indenni.

Ci si rende conto che provvedimenti di tale natura (chiusura dei frantoi prima dell'inverno e limitazione del commercio delle olive da tavola) urterebbero contro interessi economici di una certa entità e solleverebbero perciò numerose proteste. Per quanto riguarda il commercio delle olive da tavola, che sono quelle raccolte più tardivamente, sta al buon senso degli agricoltori risolvere la questione se il maggior guadagno che essi ne ritraggono non sia del tutto annullato o quasi dal minore rendimento oleario.

Soprattutto dovrebbe entrare nella coscienza di tutti la persuasione che la lotta contro la mosca dell'olivo a mezzo degli insetticidi può, analogamente a quanto non di rado si verifica nella lotta contro altri insetti di importanza economica, ridursi ad un inutile dispendio di denaro e di lavoro, se non è accompagnata dall'osservanza di alcune norme di valore preventivo e dal buon volere e dal senso di disciplina dei singoli.

RIASSUNTO

L'A. ha studiato, nella provincia di Latina, la biologia invernale e primaverile del *Dacus oleae* GMEL. (mosca olearia), insetto di importanza economica nazionale e che incide gravemente sul problema dell'alimentazione.

L'A. sostiene che la determinazione dei fattori favorenti la sopravvivenza dello

insetto, in inverno e in primavera, può suggerire metodi di lotta atti ad interromperne il ciclo vitale prima che esso invada, al principio dell'estate, gli oliveti e che convenga colpirlo nei suoi rifugi invernali, in particolare nei frantoi, veri luoghi di concentramento, questi ultimi, della specie allo stadio di pupa e di immagine, nel periodc che va dall'autunno alla primavera. Ha costatato che nel territorio di Latina gli ambienti suddetti offrono, più che il terreno degli oliveti, le condizioni di temperatura e di umidità più adatte per la sopravvivenza delle pupe e degli alati nel periodo suddetto e che la raccolta tardiva favorisce in alcune località della provincia lo sviluppo di una generazione primaverile.

L'A. propone, per le regioni oleicole a caratteri simili a quelli della provincia di Latina, alcune norme di lotta; cioè, la chiusura obbligatoria dei frantoi all'inizio dell'inverno, la limitazione del commercio delle olive da tavola alle sole località indenni — misure, queste, che possono contribuire a reprimere la dannosa pratica della raccolta tardiva — la disinfestazione dei frantoi, dei magazzini e dei luoghi di deposito in genere delle olive con insetticidi ad azione residua da eseguirsi prima della raccolta, in settembre e non oltre i primi di ottobre, ed, infine, un'attiva propaganda fra gli agricoltori diretta ad illuminarli sull'utilità dell'applicazione di tali misure.

SUMMARY

The author has studied, in the Province of Latina, the winter and spring biology of *Dacus oleae* Gmel. (the olive fly). The author sustains that the determination of those factors which favor the survival of the species during winter and spring might suggest control methods apt to interrupt its life cycle before an invasion, in the early summer, of the olive-groves. It might be worth while, therefore, to control the fly in its winter shelters. The author has observed that in Latina's territory the olive-presses offer a better environment for the pupae and adults than the olive-groves. It was obverved also that a late harvest favored in some localities of the Province the development of a spring generation. The author proposes a control scheme, where the olive-presses should be closed at the beginning of winter, the trade of selected olives should be limited to the regions were the fly is absent, the olive-presses, storages, etc. should be treated with residual insecticides before harvesting, an educational programme should be carried out among the farmers.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 2 - Aprile 1954

TOPICAL APPLICATION OF ORGANIC SOLVENTS TO HOUSEFLIES (*)

C. KOCHER and K.R.S. ASCHER (**)

Topical application, with the housefly as its most frequent object, has developed into an important tool in insecticide research. For this purpose, most workers use volatile solvents (acetone, ethanol, petroleum ether etc.), while some others prefer oils, as e.g. mineral oil (BUSVINE 1951) or corn oil (YEAGER and MUNSON 1949).

It was deemed of interest to conduct a systematic investigation as to the toxicity of the common solvents and of some oils, when applied topically to the housefly.

MATERIALS AND METHODS:

3 days old highly resistant *Musca domestica* L. (K_1 strain) (***) were used throughout this study. Flies collected in test tubes were immobilized by chilling in ice water. Normal sized females (average weight 17,5 mg) were selected thereupon and laid on filter paper disks kept on watch glasses cooled from below. The flies were dosed individually with 0.0002 ml solvent or oil applied to the ventral abdomen with the « Agla » micro-syringe (****). For each substance at least 10 × 10 flies were used, which were then transferred in batches of 10 to test tubes closed lightly with a cotton wad. The test tubes were laid horizontally into an incubator kept at 23°C and the knockdown was recorded after 24 hours.

Those solvents which gave a knockdown not differing significantly from the control values were retested at 0.0004 ml and some of them finally at the 0.001 ml level. Repetitions were always done on different days.

Results:

Results obtained with the topical application of 0.0002 ml are summarized in Table 1.

(*) A contribution from the Research Laboratories of J. R. Geigy S. A., Basle.

(**) Permanent address: *Medical Research Laboratories, Medical Corps, Israel Defence Forces.*

(***) Properties of this strain have been described by KOCHER et al. (1953).

(****) Manufactured by Burroughs Wellcome & Co., London, England.

TABLE 1

Knockdown of houseflies dosed with 0.0002 ml solvent. (*) (Temperature = 23°C; — = not done.)

*Solvent***		*Average % k. d. after 24 hours*	*Remarks*
	Control	2.0	Average from 70 × 10 flies
HYDROCARBONS:			
aliphatic	1. Petroleum ether (50°-70°)	2	
	2. Benzine (80°-110°)	0	
	3. Keronese***, refined	96	
	4. Paraffin oil	2	Though no k.d., the flies seem to be somewhat affected after 24 hours.
aromatic	5. Benzene	2	K.d. with tremors after application, but subsequent recovery
	6. Toluene	0	
	7. Xylene, mixture of isomers	100	Immediate k.d. and violent tremors.
	8. p-Cymene	100	K.d. and tremors following application.
	9. Tetralin	100	Very badly affected straightaway.
hydroaromatic	10. Cyclohexane	3	
	11. Decalin	100	Very badly affected straightaway.
	12. Turpentine oil	98	
ALCOHOLS:			
monohydric	13. Methyl alcohol	3	
	14. Ethyl alcohol	2	
	15. *iso*-Propyl alcohol	2	
	16. n-Butyl alcohol	4	
	17. n-Octyl alcohol	100	
	18. Cyclohexanol	100	Show signs of excitation after application.
	19. Tetrahydrofuryl alcohol	98	
polyhydric	20. Ethylene-glycol	—	It was found impossible to wet the abdomen of flies with these substances.
	21. Glycerol	—	

(*) It is to be assumed that with volatile solvents the actual amount delivered is less than 0.0002 ml.
(**) Classification of solvents mainly according to WEISSBERGER and PROSKAUER (1935).
(***) Predominantly aliphatic; boiling range 180°-200°.

TABLE 1 (continued)

Solvent		Average % k.d. after 24 hours	Remarks
ETHER ALCOHOL:	22. Methyl-Cellosolve	18	Two determinations gave 16 % and 20 % respectively.
KETO ALCOHOL:	23. Diacetone alcohol	60	
IMINO ALCOHOL:	24. Diethanolamine	—	Only a part of the drop could be applied.
ETHERS:	25. Diethyl ether	0	
	26. 1:4-Dioxane	23	Two determinations gave 21 % and 25 %.
KETONES:	27. Acetone	1	
	28. Methyl ethyl ketone	8	Three determinations with 8 % each.
	29. Cyclohexanone	100	Immediate k.d. and tremors.
	30. Acetophenone	100	Only very few get up after application, no tremors.
ACIDS:	31. Formic acid	100	Weak tremors, nearly immediate death.
	32. Acetic acid (glacial)	62 (!)	
ESTERS:	33. Ethyl acetate	0	
	34. Dimethyl phthalate	96	10 % still alive.
	35. Diethyl phthalate	98	28 % still alive.
	36. Dibutyl phthalate	80	All still alive.
	37. Tributyl phosphate	100	
	38. Tricresyl phosphate	15	Two determinations gave 14 % and 16 %.
CHLORINATED HYDROCARBONS:			
aliphatic-saturated	39. Chloroform	1	
	40. Carbon tetrachloride	0	
» - *unsaturated*	41. Trichloroethylene	1	
	42. Tetrachloroethylene	3	K.d. and tremors, but subsequent recovery.
aromatic	43. Chlorobenzene	100	Immediate k.d. and slow tremors, death after a few minutes.
AMINE:	44. Aniline	100	Immediate k.d. and extremely violent tremors.
NITRILE:	45. Acetonitrile	2	
OILS:	46. Castor oil	8	Two determinations gave 8 % each.
	47. Olive oil	3	Nearly colorless. Another deep yellow sample was found to be toxic (70 % k.d.).

The results obtained with substances, which had been found non-toxic at 0.0002 ml and which were retested at 0.0004 ml, are summarized in Table 2.

TABLE 2

Knockdown of houseflies dosed with 0.0004 ml solvent.
(Temperature = 23°C).

Solvent	*Average % k. d. after 24 hours*	*Remarks*
1. Petroleum ether . .	0	
2. Benzine	60-85	Several replications.
4. Paraffin oil	4-16	Several replications. Some flies stick to the receptables after this application; though they succeed to disengage themselves subsequently, this may cause k.d.
5. Benzene	4	
6. Toluene	25	Immediate k.d. and tremors after application.
10. Cyclohexane . . .	3	Two determinations gave 2 % and 4 %.
13. Methyl alcohol . .	0	
14. Ethyl alcohol . . .	0	
15. *iso*-Propyl alcohol .	2	
16. n-Butyl alcohol . .	96	
25. Diethyl ether . . .	0	Actual amount delivered is probably less than 0.0004 ml.
27. Acetone	0	
33. Ethyl acetate . . .	0	
39. Chloroform	0	
40. Carbon tetrachloride	4	
41. Trichloroethylene .	0	
42. Tetrachloroethylene	100	
45. Acetonitrile	0	
47. Olive oil	2	

The quantity of oil applied to flies by BUSVINE (1951) and by YEAGER and MUNSON (1949) was 0.0004 ml and (approximately) 0.0005 mg respectively. On the other hand, MARCH and METCALF (MARCH and METCALF 1949, MARCH et al. 1952) and BERAN (1953) applied amounts as high as 0.001 ml (approximately 0.79 mg) acetone to the dorsal thorax. Since the latter author worked with groups of flies of average weights of 15, 12 and 9.6 mg, acetone amounting to approximately 5.3, 6.6 and 8.2% respectively of the flies' weight was applied PRATT and BABERS (1953) apply even slightly more of this solvent (0.00114 ml per fly).

Solvents which were satisfactory at the 0.0004 ml level (and paraffin oil) were tested further at 0.001 ml (Table 3). Observation vessels in this case were perforated cellophane bags, as used by BERAN (1953).

TABLE 3

Knockdown of houseflies dosed with 0.001 ml solvent.
(Temperature = 23°C).

Solvent	*Average % k. d. after 24 hours*	*Remarks*
1. Petroleum ether . .	32	
4. Paraffin oil	30	Flies stick to cellophane bags.
5. Benzene	20	
10. Cyclohexane . . .	20	
13. Methyl alcohol . .	12	
14. Ethyl alcohol . . .	10	
15. *iso*-Propyl alcohol .	50	
25. Diethyl ether . . .	20	
27. Acetone	6	
33. Ethyl acetate . . .	14	
39. Chloroform	2	
40. Carbon tetrachloride	8	
41. Trichloroethylene .	4	
45. Acetonitrile	0	
47. Olive oil	86 (!)	Flies stick to cellophane bags.

Though applications to thorax and abdomen may yield different results (see e.g. TAHORI and HOSKINS 1953), it seems that it would be desirable only in rare cases to work with such massive amounts of solvent. The quantity of choice is probably 0.0004 ml.

DISCUSSION:

It is of interest to compare the results of this study with the investigations of MADDEN et al. (1947), who immersed housefly larvae in solvents. The following table gives a comparison of the inherent toxicities of solvents to these two different stages of the housefly:

TABLE 4

Solvent	Immersion of larvae (Madden et al. 1947)	Topical application to adults (this study)
2. Benzine	++	++
3. Kerosene *	+	+++
5. Benzene	—	—
7. Xylene, mixture of isomers	++	+++
9. Tetralin	+++	+++
12. Turpentine oil	++	+++
26. 1:4-Dioxane	+++	++
27. Acetone	+++	—
29. Cyclohexanone	+++	+++
34. Dimethyl phthalate	—	+++
36. Dibutyl phthalate	—	+++
40. Carbon tetrachloride	+	—
41. Trichloroethylene	+++	—

(*) Probably of different composition
— comparatively non-toxic
+ slightly toxic
++ moderately toxic
+++ highly toxic

Though evidently these results cannot be compared straightaway (different modes and quantities of application to different stages), one may conclude that benzene is relatively non-toxic to both stages and that some solvents (e. g. tetralin, cyclohexanone) have a high inherent toxicity for both stages, while others (as e. g. acetone, dimethyl phthalate, dibutyl phthalate, trichloroethylene) have specific toxicities for one stage only and are non-toxic to the other one.

SUMMARY

An investigation as to the suitability of solvents and oils for topical application to houseflies was done. Of 47 substances applied to the ventral abdomen of houseflies (kept for observation at 23°C), 14 (petroleum ether, benzene, cyclohexane, methyl alcohol, ethyl alcohol, *iso*-propyl alcohol, diethyl ether, acetone, ethyl acetate, chloroform, carbon tetrachloride, trichloroethylene, acetonitrile and olive oil) were found to be non-toxic at a rate of 0.0004 ml per fly.

RIASSUNTO

E' stata eseguita una ricerca sulla idoneità dei solventi ed olii per applicazioni topiche sulle mosche domestiche. Di 47 sostanze applicate sulla parte ventrale dell'addome di mosche (tenute sotto osservazione a 23°C), 14 di queste (etere di petrolio, benzene, cicloesano, alcool metilico, alcool etilico, alcool isopropilico, etere etilico, acetone, acetato d'etile, cloroformio, tetracloruro di carbonio, tricloroetilene, acetonitrile ed olio di oliva) sono risultate non tossiche a dosi di 0,0004 ml per mosca.

BIBLIOGRAPHY

Beran F. (1953). *Pflanzenschutzber.* (Vienna), *11*, 151.

Busvine J. R. (1951). *Nature 168*, 193.

Kocher C., Roth W. and Treboux J. (1953). *Anz. Schädlingsk*, *26* (5), 65.

Madden, A. H., Lindquist, A. W. and Jones, H. A. (1947). *Soap*, *23* (3), 141.

March, R. B. and Metcalf, R. L. (1949). *Calif. Dept. Agr. Bul.*, *38*, 93.

March, R. B., Metcalf, R. L. and Lewallen, L. L. (1952), *J. Econ. Ent. 45*, 851.

Pratt, J. J. and Babers, F. H. (1953). J. *Econ. Ent.*, *46*, 864.

Tahori, A. S. and Hoskins, W. M. (1953). *J. Econ. Ent.*, *46*, 829.

Weissberger, A. and Proskauer, E. (1935). « Organic Solvents», Oxford University Press.

Yeager, J. F. and Munson, S. C. (1949). *J. Econ. Ent. 42*, 874.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 2 - Aprile 1954

CHEMICALS AFFECTING THE PREIMAGINAL STAGES OF THE HOUSEFLY

IV. (*) THE FATTY ACIDS

ZWI H. LEVINSON and K.R. SIMON ASCHER (**)

INTRODUCTION.

In the course of a study on the lipid requirements of *M. vicina* Macq., high mortalities were encountered in rearing diets containing coconut-fatty acids (SILVERMAN and LEVINSON 1954). This recalls the observation (SIEGLER and POPENOE 1924) that certain fractions of coconut oil distillates exert a toxic action on *Aphididae*. Subsequently the toxicity of non-branched fatty acids for *Aphididae* was shown to increase with molecular weight up to C_{10} or C_{12}, above this point the toxicity diminished rapidly (SIEGLER and POPENOE 1925, TATTERSFIELD and GIMINGHAM 1927, DILLS and MENUSAN 1935). An investigation of the even-numbered and some of the odd-numbered fatty acids from C_6 to C_{18} (including oleic and linoleic acid) as larvicides for *Musca vicina*, appeared therefore indicated.

MATERIALS AND METHODS.

Chemicals: Chemically pure caproic, heptanoic, caprylic, pelargonic, capric, undecanoic, lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic and chaulmoogric acid (supplied by Eastman-Kodak and BDH) were used in the course of this study.

Biological Material: A laboratory bred strain of *M. vicina* provided the larvae used. Tests were carried out with larvae 3, 5 and 7 days old. Larvae

---

(*) Part II: ASCHER, LEVINSON, SILVERMAN and TAHORI, *Riv. Parassit.*, *15*, 45 (1954); Part III: ASCHER and LEVINSON, *Riv. Parassit.*, *15*, 57 (1954).

(**) *Medical Research Laboratories, Medical Corps, Israel Defence Forces, Israel.*

were collected by using their klinotactic responses, by the method described in Part III.

DESCRIPTION OF THE TESTS.

Combined contact-vapour action on larvae.

Circles of filter paper Whatman No. 1 (9 cm. diam.) were impregnated with the liquid or molten fatty acids by immersion. The amount of fatty acid on each filter paper was approximately 0.5 grams. The impregnated filter paper disks were placed in Petri-dishes (9 cm. diam.), and 20 larvae were introduced. The experiments were carried out at 28°C and 50-60% RH. Mortality counts were made 1, 2, 3, 12 and 24 hours after the beginning of the experiment. This procedure was also followed for the determination of the mean lethal time. Test series with larvae of each stage were repeated at least 4 times.

Vapour action on third stage larvae, and pupae.

This test was carried out according to the method described in Part II. In this work 50 seven days old larvae were exposed to the vapours of various fatty acids. Each test was repeated 3 times.

Larvicidal action in breeding media.

The method described in Part II was used. The fatty acids were added to the test media (wheat bran) so as to give a final concentration of 1, 2.5 and 5%. In each experiment the test medium was observed for the presence of fungi.

Larvicidal action in a medium free of lipids except cholesterol.

A lipid free medium was prepared by extracting wheat bran exhaustively with ether and chloroform. In order to compensate for the loss of growth and pupation factors, soluble in ether and chloroform, which had been removed during the extraction, cholesterol (0.17%) and dried yeast extract (2.5%) were added (BERGMANN and LEVINSON 1954). The fatty acids were then added to give final concentrations of 1 and 5%. The procedure was then continued as with normal breeding media. Observations on mortality were taken after 48 hours only.

RESULTS.

Combined contact-vapour action.

The results of these tests are summarized in Table 1.

TABLE 1.

Combined contact-vapour action of some even-numbered fatty acids on larvae. (T = 28°C; RH = 50-60 %).

Fatty Acid	No. of Carbon Atoms	Age of Larvae in Days	Contact Time in Hours: Mean Per Cent Larval Mortality				
			1	2	3	12	24
Caproic acid	6	3	100				
		5	100				
		7	100				
Caprylic acid	8	3	100				
		5	100				
		7	100				
Capric acid	10	3	100				
		5	100				
		7	100				
Lauric acid	12	3					0
		5					0
		7					0
Myristic acid	14	3					0
		5					0
		7					0
Palmitic acid	16	3					0
		5					0
		7					0
Stearic acid	18	3					0
		5					0
		7					0
Oleic acid	18	3	0	8	43	100	
		5	0	3	43	100	
		7	0	15	60	100	
Linoleic acid	18	3	30	43	100		
		5	25	35	100		
		7	20	65	100		
Control		3					0
		5					0
		7					0

Essentially the same results were obtained when this experiment was repeated at 35°C. Caproic, caprylic and capric acid have the most rapid and

uniform lethal action on larvae of the 3 stages tested, whereas linoleic and oleic acid caused a progressive mortality reaching 100% only after a contact of 3 and 12 hours, respectively. The higher saturated fatty acids (from lauric to stearic acid) were practically non-toxic, 7 days old larvae pupating normally in contact with them.

In Table 2, the mean lethal times for the most toxic fatty acids are summarized.

TABLE 2.

Mean time required by fatty acids to cause 100 % *mortality* (T = 28°C; RH = 50-60 %).

Fatty acid	No. of Carbon Atoms	Larval age in days		
		3	5	7
		Minutes		
Caproic acid	6	7	7	9
Caprylic acid . . .	8	5	5	7
Capric acid	10	5	5	7
Control	. . . . .	No death after 24 hours,		Normal pupation

Deviation from mean: ± 5%

Caprylic and capric acid act most quickly, caproic acid somewhat more slowly, while the time required for linoleic and oleic acid to kill larvae was 2.5 and 11 hours, respectively. After contact with caproic or caprylic acid, the larvae were always of a typical elongated appearance and the white colour of their integument changed rapidly to a dark yellowish tint. After exposure to capric, linoleic or oleic acid the larvae became strongly dessicated.

Vapour action on larvae and pupae.

In these tests butyric acid was included. While the vapour of butyric acid killed larvae within 20 minutes of exposure, none of the vapours of the other fatty acids tested were toxic to third stage larvae, nor had they any influence on normal pupation. From the pupae obtained, flies emerged at a normal rate, even if the pupae were left in the fumigation chambers until the emergence of adults. The lethal action exibited by filter papers impregnated with caproic, caprylic, capric, linoleic and oleic acid to third stage larvae is therefore due to contact action only.

Larvicidal action in breeding media.

The results of the larvicidal tests in normal breeding media are summarized in Table 3.

TABLE 3.

Larvicidal action of the fatty acids on second stage larvae in breeding media (T = 35°C).

Fatty acid	No. of Carbon Atoms	Concentration in Breeeding Media (*)			
		2.5 %		5.0 %	
		Observation Time, Hours			
		24	48	24	48
		Mean Percent Larval Mortality			
Caproic acid	6	5.0	17.5	41.0	87.5
Heptanoic acid . . .	7	5.0	18.0	45.0	90.0
Caprylic acid . . .	8	5.5	19.0	58.5	90.0
Pelargonic acid . .	9	8.0	21.0	60.0	92.5
Capric acid	10	8.0	20.5	65.0	94.0
Undecanoic acid . .	11	—	—	40.0	62.0
Lauric acid	12	1.0	3.0	32.0	42.5
Myristic acid . . .	14	3.5	6.5	2.5	7.5
Palmitic acid . . .	16	3.5	2.0	1.5	5.5
Stearic acid	18	4.0	4.5	5.0	5.5
Oleic acid	18	1.5	3.0	5.0	4.5
Linoleic acid . . .	18	1.5	2.5	6.0	7.5
Chaulmoogric acid .	18	0	0	0	2.5
Control		0	1.0	0	1.0

(*) At a concentration of 1%, no significant difference from control was obtained.

Caproic, caprylic and capric acid exhibited the highest toxicity in these tests.

For undecanoic and subsequently lauric acid there was a considerable drop in toxicity, while the rest of the acids tested were only slightly toxic for the larvae. Chaulmoogric acid was entirely non-toxic.

Larvicidal action in a medium free of lipids except cholesterol.

It has been found previosly that wheat bran contains 4.9% total lipids per dry weight. At a density of 1.5 individuals per gram, larvae reduce during their entire feeding period the lipid content of the medium by almost 79% (LEVINSON and SILVERMAN 1954). In order to obtain an idea of the toxicity of

the fatty acids, without interference from the complex mixture of lipids in the medium, tests were carried out in a medium lacking in lipids, except for the essential growth and pupation factor, cholesterol. The results are presented in Table 4.

TABLE 4.

Larvicidal action of the fatty acids on second stage larvae in a medium free of lipids except cholesterol.

(T = 35°C) Concentration in breeding media 5% (*)

Fatty Acid	No. of Carbon Atoms	Mean Per Cent Larval Mortality after 48 hours
Caproic acid	6	84,0
Caprylic acid	8	97,0
Capric acid	10	96,0
Lauric acid	12	100,0
Myristic acid	14	11,0
Palmitic acid	16	4,5
Stearic acid	18	0,0
Oleic acid	18	4,5
Linoleic acid	18	2,0
Control		1,0

(*) At a concentration of 1%, no significant difference from control was obtained.

Larval mortality was essentially the same as in normal media, except in the case of lauric acid. While 5% lauric acid was only moderately toxic in normal medium, it was highly toxic in a medium free of lipids except for cholesterol. Several cases of early pupation were observed in both test media containing 2.5 and 5% caproic acid. The larvae pupated 2 days before the larvae in the control media and produced, therefore, undersized puparia.

Larvicidal and fungistatic activity.

The influence of the acids on the growth of fungi (species of *Penicillium* and *Aspergillus*) as observed in the test media, paralleled the larvicidal efficiency. Table 5 gives a comparative estimate of the fungistatic and larvicidal efficiency of the fatty acids in normal breeding media.

TABLE 5.

Relative Fungistatic and Larvicidal Efficiency of the Fatty acids.

Fatty Acid	No. of Carbons Atoms	Fungistatic Efficiency	Larvicidal Efficiency
Caproic acid	6	+ + + +	+ + +
Heptanoic acid	7	+ + +	+ + +
Caprylic acid	8	+ + +	+ + +
Pelargonic acid	9	+ + +	+ + +
Capric acid	10	+ + +	+ + +
Undecanoic acid	11	+ +	+ +
Lauric acid	12	+	+
Myristic acid	14	—	—
Palmitic acid	16	—	—
Stearic acid	18	—	—
Oleic acid	18	—	—
Linoleic acid	18	—	—
Control		—	—

Explanation of the symbols for fungistatic efficiency:
+ + + + complete inhibition of growth at 1, 2.5 and 5 %.
+ + + complete inhibition of growth at 2.5 and 5 % and partial inhibition of growth at 1 %.
+ + partial inhibition of growth at 2.5 and 5 %, no inhibition of growth 1 %.
+ partial inhibition of growth at 5 %, no inhibition of growth at 1 and 2.5 %.
— no inhibition of growth at 1, 2.5 and 5 %.

No fungi grew in media free of lipids except for cholesterol, probably due to the sterilising effect of the extracting solvents and lack in some essential factors.

DISCUSSION.

The toxicological difference of the fatty acids, especially of caproic, heptanoic, caprylic, pelargonic and capric acid to different insects is remarkable. While contact toxicity to several species of aphids was found to increase by a factor of approximately 2.2 for every additional carbon atom, from C_4 to C_{10}, (TATTERSFIELD and GIMINGHAM 1927) the toxicities of the fatty acids for larvae of *M. vicina* have now been shown to increase only slightly from C_5

to C_{10}. A similar behaviour has previously been noted for larvae of *Phormia terraenovae*, the threshold molar concentrations required for paralysis not increasing with molecular weight in the lower homologues of the fatty acids (HURST 1943, 1943a).

As the larval cuticle of *Musca* has both hydrophilic and lipophilic properties (PAL 1950), the water solubility of the fatty acids, i.e. their penetrating power, may be an important factor. The drop in toxicity on passing from capric to undecanoic acid may thus be due to water insolubility of the latter.

Fungistatic activity has been observed for some fatty acids, especially for propionic acid (HOFFMAN et al. 1939, HARSHBARGER 1942). The striking resemblance between larvicidal and fungistatic efficiency (against *Aspergillus* and *Penicillium*) observed in the course of this study may even indicate an analogy in the mode of action on larvae and fungi.

SUMMARY

1. The comparative toxicity of the even-numbered fatty acids from C_6 to C_{18}, of some of the odd-numbered saturated fatty acids and of oleic, linoleic and chaulmoogric acid to the larva of *M. vicina* Macq. was determined. Caproic, caprylic and capric acid are rapidly acting poisons.

2. The toxicity of the saturated fatty acids increases slightly from caproic to capric acid, and decreases from undecanoic to lauric acid, when the acids are included in a concentration of 5 per cent in the larval food.

3. Lauric acid has no contact toxicity, but exerts a high stomach toxicity in presence of cholesterol in a lipid free medium. This stomach toxicity is reduced by the lipids of the breeding medium.

4. Linoleic and oleic acid are slowly acting contact poisons and are only very slightly toxic, when included in a concentration of 5% in the larval diet.

5. Myristic, palmitic and stearic acid have no contact toxicity and no stomach toxicity.

6. Chaulmoogric acid is non-toxic when included in a concentration of 5% in the larval food.

7. The fatty acids from C_6 to C_{18} including oleic, linoleic and chaulmoogric acid have no appreciable vapour toxicity.

8. The larval toxicity of the fatty acids (C_6 to C_{12}) is paralleled by their fungistatic effect.

RIASSUNTO

1. E' stata determinata la tossicità comparata di acidi grassi a numero di carbonio pari da C_6 a C_{18}, di alcuni degli acidi grassi a numero di carbonio dispari e dell'acido oleico, linoleico e caulmugrico verso la larva di *Musca vicina* Macq. Gli acidi caproico, caprilico e caprico sono veleni ad azione rapida.

2. La tossicità degli acidi grassi saturi aumenta leggermente dall'acido caproico al caprico, e decresce dall'acido undecanoico al laurico qualora gli acidi vengano inclusi alla concentrazione del 5% nel nutrimento larvale.

3. L'acido laurico non possiede alcuna tossicità per contatto, ma esercita un'alta tossicità per ingestione in presenza di colesterolo in un mezzo nutritivo privo di grassi. Questa tossicità per ingestione viene ridotta dai lipidi del mezzo nutritivo.

4. Gli acidi linoleico ed oleico sono veleni per contatto ad azione lenta e sono solo leggermente tossici, quando inclusi alla concentrazione del 5% nel nutrimento larvale.

5. Gli acidi miristico, palmitico e stearico non hanno tossicità nè per contatto nè per ingestione.

6. L'acido caulmugrico non è risultato tossico se incluso alla concentrazione del 5% nel nutrimento larvale.

7. Gli acidi grassi dal C_6 al C_{18}, inclusi gli acidi oleico, linoleico e caulmugrico, non hanno alcuna apprezzabile azione fumigante.

8. La tossicità larvale da parte degli acidi grassi (dal C_6 al C_{12}) è parallela alla loro attività fungistatica.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the advice given by Prof. Ernst D. Bergmann in the course of this work and in the preparation of the manuscript.

They are greatly indebted to Miss Dalia Borowich and to Miss Vida Silaniko for excellent technical assistance.

LITERATURE CITED

Ascher, K.R.S., Levinson, Z. H., Silverman, P. H. and Tahori, A. S. (1954). *Riv. Parassit., 15,* 45 Part II.
Ascher, K.R.S. and Levinson, Z. H. (1954). *Riv. Parassit., 15,* 57 Part III.
Bergmann, E. D. and Levinson, Z. H. (1954). *Nature, 173,* 211.
Dills, L. E. and Menusan, H. (1935). *Contr. Boyce Thompson Inst. 7,* 63.
Harshbarger, K. E. (1942). *J. Dairy Sci. 25,* 196.
Hoffmann C., Schweizer, T. R. and Dalby, G. (1939). *Food Research 4,* 539.
Hurst, H. (1943). *Trans. Faraday Soc., 39,* 390.
Hurst, H. (1943a). *Nature, 156,* 292.
Levinson, Z. H., and Silverman, P. H. (1954). *Biochem. J.* (in press).
Pal, R. (1950). *Bull. Ent. Res., 41,* 121.
Siegler, E. H., and Popenoe, C. H. (1924). *Journ. Agric. Res., 29,* 259.
Siegler, E. H. and Popenoe, C. H. (1925). *J. Econ. Ent., 18,* 292.
Silverman, P. H. and Levinson, Z. H. (1954). *Biochem. J.* (in press).
Tattersfield, F. and Gimingham, C. T. (1927). *Ann. Appl. Biol., 14,* 331.

Direttore responsabile: Dott. E. Mosna

Soc. An. Poligrafica Italiana — Roma, Via della Guardiola, 22

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XV - N. 3 - Luglio 1954

OSSERVAZIONI SULL'INFEZIONE DA *PLASMODIUM BERGHEI* IN RATTI TENUTI A DIETA LATTEA

AUGUSTO CORRADETTI, LEONARDO TENTORI
E FELICE VEROLINI (*)

MAEGRAITH, DEEGAN e JONES 1) osservarono nel 1952 che le infezioni da *P. berghei* non si sviluppavano o si sviluppavano assai stentamente nei ratti che erano mantenuti a dieta lattea. Da questa osservazione dedussero che il latte doveva contenere qualche cosa che inibiva o limitava lo sviluppo della fase asessuale del *P. berghei* trasmesso al ratto mediante inoculazione di sangue.

Subito dopo BRAY e GARNHAM 2) comunicarono di aver ottenuto una notevole limitazione dello sviluppo di *P. cynomolgi* in due scimmie mantenute a dieta lattea ed inoculate con sporozoiti.

HAWKING 3) ripetè, confermandoli, gli esperimenti di MAEGRAITH, DEEGAN e JONES sul *P. berghei* nel ratto e dimostrò che l'aggiunta di acido p-aminobenzoico alla dieta lattea rendeva di nuovo il ratto suscettibile ad una infezione grave come nei controlli. Egli giunse pertanto alla conclusione che l'azione «soppressiva» del latte sul *P. berghei* deriva dall'assenza di acido p-aminobenzoico e che questo (o qualche derivato) costituisce un metabolita essenziale per il *P. berghei*.

RODHAIN 4) osservò successivamente che la dieta lattea proteggeva i topi dall'infezione da *P. vinckei*, ma non da quella da *P. berghei* (come è noto i topi sono assai più suscettibili dei ratti ad avere una grave infezione da questo plasmodio). Egli comunicò anche che la dieta lattea non esercitava alcuna azione protettrice sul topo riguardo alla infezione da *Babesia rodhaini*.

RAMAKRISHNAN 5) osservò che lasciando senza cibo i ratti infettati con *P. berghei* si aveva una forte riduzione della parassitemia, mentre somministrando di nuovo una dieta normale la parassitemia tornava alta. In un altro

(*) *Istituto Superiore di Sanità.*

lavoro RAMAKRISHNAN, SATYA PRAKASH, KRISHNASWAMI e CHANAN SINGH 6) osservarono il comportamento del *P. berghei* in ratti tenuti a dieta lattea, giungendo alla conclusione che i parassiti comparivano in tutti i ratti a dieta lattea per 15-16 giorni, ma che l'intensità dell'infezione era inferiore a quella dei controlli.

Recentemente GALLIARD (7) ha comunicato, in una lettera all'editore dei Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and. Hygiene, di essere riuscito, nei suoi esperimenti, sia ad infettare con *Plasmodium berghei* rattini lattanti ottenendo percentuali di globuli rossi infettati dal 80 al 90% sia ratti adulti del peso di gr. 200 e a dieta lattea. HAWKING e MAEGRAITH in una risposta pubblicata sullo stesso numero dei Transactions sottolineano la possibilità che le condizioni sperimentali seguite da GALLIARD siano differenti. Secondo questi Autori infatti i risultati che si ottengono nei ratti lattanti dipendono in gran parte dalla composizione della dieta con cui si alimentano le madri, che può essere più o meno ricca di acido p-aminobenzoico.

Data la non assoluta omogeneità dei risultati finora ottenuti, abbiamo voluto portare un contributo a questo interessante problema.

Esperimenti.

Per i presenti esperimenti sono stati usati ratti di 2-3 mesi di età. Due diversi ceppi *P. berghei* sono stati usati: il primo è quello dello Istituto Superiore di Sanità che ci fu inviato cinque anni fa dal dr. VINCKE direttamente dal Congo Belga; il secondo è quello della London School of Hygiene and Tropical Medicine gentilmente fornitoci recentemente dal prof. GARNHAM. Il latte era quello normalmente in commercio a Roma. Negli esperimenti in cui è stato aggiunto al latte acido p-aminobenzoico questo veniva addizionato nella proporzione dell'1 per mille.

Sono state usate tutte le precauzioni necessarie perchè i ratti fossero tenuti, sia per un determinato numero di giorni prima della infezione che per tutta la durata di essa, rigorosamente alla rispettiva dieta prestabilita, in modo da escludere la possibilità di qualsiasi causa di errore.

Gli esperimenti compiuti sono stati quattro ed i ratti sperimentati complessivamente 62. Gli esperimenti compiuti ed i loro risultati sono sinteticamente espressi nella tabella.

I presenti esperimenti dimostrano che nei ratti albini, dell'età di 2-3 mesi e del peso di circa 130-150 grammi il *P. berghei* si sviluppa ugualmente sia che gli animali ospiti siano tenuti a dieta normale sia che siano tenuti a dieta lattea o a dieta lattea + acido p-aminobenzoico.

Questi risultati che appaiono in netto contrasto con quelli degli AA. inglesi rivelano a nostro giudizio che il problema è in termini più complessi di quanto non sia stato finora messo in evidenza.

Con i nostri esperimenti abbiamo subito voluto escludere che ci si trovasse di fronte a differenze relative al parassita. Era infatti possibile che nei diversi laboratori si fossero venuti selezionando ceppi di *P. berghei* che avessero un diverso grado di capacità di svilupparsi in ratti tenuti a dieta lattea. L'esperimento in proposito da noi fatto paragonando nei nostri ratti tenuti a dieta lattea il nostro ceppo con quello di GARNHAM non ha rivelato differenze sostanziali.

La divergenza tra i nostri risultati e quelli degli AA. inglesi può quindi essere spiegata o con differenze relative alla composizione del latte o con differenze relative alla flora intestinale dei ratti utilizzati per gli esperimenti.

La composizione del latte può variare entro certi limiti, in dipendenza di una quantità di fattori. E' quindi possibile che sostanze presenti in un

Comportamento dell'infezione da P. berghei *in ratti a dieta lattea, in ratti a dieta lattea + PAB, e in ratti di controllo a dieta normale.*

		A dieta lattea			A dieta lattea + P. A. B.			Controlli a dieta normale		
Numero dell' esperimento	Giorni di dieta lattea prima dell'inoculazione	Numero dei ratti esperimentati	Numero dei ratti che si infettarono	Numero dei ratti in cui si ebbe + del venti per cento di eritrociti infetti	Numero dei ratti esperimentati	Numero dei ratti che si infettarono	Numero dei ratti in cui si ebbe + del 20 per cento di eritrociti infetti	Numero dei ratti esperimentati	Numero dei ratti che si infettarono	Numero dei ratti in cui si ebbe + del 20 per cento di eritrociti infetti
Ceppo di *P. berghei* del nostro laboratorio										
1	3	4	4	4	4	4	4	2	2	2
2	6	14	14	13	2	2	2	—	—	—
3	14	20	20	19	—	—	—	4	4	4
Ceppo di *P. berghei* dell' Istituto di Medicina Tropicale di Londra										
4	12	10	10	6	—	—	—	2	2	2

tipo di latte possano mancare o essere estremamente ridotte in un altro. Riguardo all'acido p-aminobenzoico, chiamato in causa dalla maggior parte degli AA., è generalmente riconosciuto che esso esiste nel latte solo in tracce (0,004 parti per milione secondo HAWKING). Comunque le possibili variazioni del contenuto di esso in campioni di latte di vacca di provenienza diversa dovrebbero essere insignificanti. Maggior importanza, a nostro parere, potrebbe essere invece assegnata alle eventuali variazioni nel contenuto

di acido folico nel latte. E' noto infatti che questa vitamina contiene acido p-aminobenzoico nella sua molecola ed è presente nel latte di vacca in quantità notevolmente superiori: circa γ 12,5% in confronto a γ 0,4% di acido p-aminobenzoico 8).

Tentativi da noi compiuti per rivelare la presenza di acido p-aminobenzoico nel nostro latte hanno dimostrato che la quantità esistente era al di sotto della sensibilità del metodo chimico colorimetrico usato (9-10).

Il problema è ulteriormente complicato dal fatto, a tutti noto, che il ratto ha un fabbisogno vitaminico ed in conseguenza un contenuto vitamico nei suoi organi e tessuti estremamente variabile. Indipendentemente dall'apporto esogeno con la dieta esiste infatti, per molti fattori vitaminici del gruppo B, una sintesi operata dalla flora presente nel tratto intestinale. Queste vitamine così sintetizzate in parte vengono assorbite e sono quindi messe a disposizione dell'organismo. Ne viene come diretta conseguenza che tra i fattori che possono influenzare il contenuto di vitamine nell'organismo si debbono considerare anche quelli che modificano la normale composizione della flora intestinale ed in primo luogo quindi le variazioni qualitative della dieta.

Tutte le possibili spiegazioni, rientrano per ora nel campo delle ipotesi di lavoro, destinate ad essere confermate o respinte da prove sperimentali. La conclusione finale che al momento attuale sorge dal complesso dei risultati ottenuti da tutti gli esperimentatori è che l'assenza del *P. berghei* in ratti mantenuti a dieta lattea appare essere subordinata alla esistenza di certi fattori che non sempre si verificano in condizioni naturali nel materiale di esperimento. Di conseguenza l'azione soppressiva del latte sul *P. berghei* può risultare totale (come negli esperimenti degli AA. inglesi), parziale (come negli esperimenti degli indiani), o nulla (come nei nostri esperimenti).

RIASSUNTO

Si sono compiuti esperimenti sullo sviluppo del *P. berghei* in ratti tenuti a dieta lattea. Sono stati usati due diversi ceppi del parassita (1 - Istituto Superiore di Sanità. 2 - London School of Tropical Medicine). I parassiti si sono sviluppati nei ratti a dieta lattea come nei controlli. Tali risultati sono diversi da quelli ottenuti da altri esperimentatori. Si espongono le possibili cause della non omogeneità dei risultati ottenuti da differenti ricercatori.

SUMMARY

Experiments on 62 rats showed no suppressive action of the milk diet on *P. berghei* (two different strains). Parasites developed in milk diet rats as well as in normal diet rats. These results are differing from those of other Authors. The possible reason of these non-homogeneous results of different investigators are briefly discussed.

BIBLIOGRAFIA

1) Maegraith B. G., Deegan T. e Jones E. S. (1952). Suppression of malaria (*P. berghei*) by milk. *British Medical Journal, 2,* 1382.
2) Bray R. S. e Garnham P.C.C. (1953). Effect of milk diet on *P. cynomolgi* infections in monkeys. *British Medical Journal, 1,* 1200.
3) Hawking F. (1953). Milk diet, p-aminobenzoic acid, and malaria (*P. berghei*). Preliminary communication. *British Medical Journal, 1,* 1201.
4) Rodhain J. (1953). L'action de la diète lactée sur les infections à *P. berghei, P. vinckei* et *Babesia rodhaini* chez les souris. *Ann. Soc. Belge de Med. Trop. 33, 3,* 245-257.
5) Ramakrishnan S. P. (1953). Studies on *P. berghei* n. sp. Vincke and Lips, 1948. VIII. The course of blood-induced infection in starved albino rats. *Indian J. Malariology, 7, 1,* 53-60.
6) Ramakrishnan S. P., Satya Prakash, Krishnaswami A. K. e Chanan Singh (1953). Studies on *P. berghei* n. sp. Vincke and Lips, 1948. IX. Effect of milk diet on the course of blood-induced infection in albino rats. *Indian J. Malariology., 7, 1,* 61-65.
7) Galliard H. (1954): Malaria and P.A.B. in the diet. *Trans of Rey. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 48,* n. 2, 274.
8) Williams e Coll. (1950): The biochemistry of B vitamins, Reinhold Pubblishing Corp., New York.
9) Hutchings B. L. e Coll. (1948): *Journ. Biol. Chem., 168,* 705.
10) Gyorgy P. (1950): Vitamin Methods. Academic Press Inc., New York.